

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katja STOPAR

**GENETSKA DIFERENCIACIJA KLOBUČNJAŠKIH MEDUZ Z
ANALIZO GENETSKIH MARKERJEV IZ MITOHONDRIJSKE IN
JEDRNE DNA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**GENETIC DIFFERENTIATION OF SCYPHOZOAN JELLYFISH
REVEALED BY ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL AND NUCLEAR
GENETIC MARKERS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2011

Doktorska disertacija je zaključek Podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti, znanstveno področje genetika. Delo je bilo opravljeno na Morski biološki postaji v Piranu, ki je dislocirana organizacijska enota Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani.

Po sklepu Senata Biotehniške fakultete in po sklepu 17. seje Senata Univerze z dne 12.02. 2009 je bila za mentorico doktorske disertacije z naslovom "Genetska diferenciacija klobučnjaških meduz z analizo genetskih markerjev iz mitohondrijske in jedrne DNA" imenovana doc. dr. Andreja Ramšak.

Mentor: doc. dr. Andreja Ramšak

Komisija za oceno in zagovor:
(po sklepu Senata Biotehniške fakultete z dne 30.05.2011)

Predsednik: prof. dr. Peter Dovč
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Član: prof. dr. Alenka Malej
Nacionalni inštitut za biologijo, Morska biološka postaja Piran

Član: doc. dr. Andreja Ramšak
Nacionalni inštitut za biologijo, Morska biološka postaja Piran

Datum zagovora: 18.10.2011

Doktorska disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo doktorske disertacije v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Izjavljam, da je doktorska disertacija oddana v elektronski obliki identična tiskani verziji.

Doktorand:

Katja STOPAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
 DK UDK: 575.17:577.2:593.73(043.3)=163.6
 KG klobučnjaške meduze/ mesečinka - *Pelagia noctiluca*/ uhati klobučnjak - *Aurelia aurita*/ veliki klobučnjak - *Rhizostoma pulmo*/ mitohondrijski in jedrni markerji/ zaporedja DNA/ COI/ ITS1/ ITS2/ genetska variabilnost/ filogeografija
 KK
 AV STOPAR, Katja, uni. dipl. biol., prof. biol.
 SA RAMŠAK, Andreja (mentor)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, znanstveno področje genetika
 LI 2011
 IN GENETSKA DIFERENCIACIJA KLOBUČNJAŠKIH MEDUZ Z ANALIZO GENETSKIH MARKERJEV IZ MITOHONDRIJSKE IN JEDRNE DNA
 TD Doktorska disertacija
 OP XII, 92 str., 14 pregl., 22 sl., 3 pril., 252 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Poznavanje genetske raznolikosti klobučnjakov v evropskih morjih in tudi v ostalih svetovnih morjih je razmeroma skromno. Namen te raziskave je bil ugotoviti filogeografsko strukturo izbranih vrst klobučnjakov v evropskih morjih. Meduze mesečink (*Pelagia noctiluca*), velikih klobučnjakov (*Rhizostoma pulmo*) in uhatih klobučnjakov (*Aurelia aurita*) so bile vzorčene na različnih geografskih območjih Sredozemskega in Črnega morja, severnega Atlantskega oceana, Severnega in Baltskega morja. V filogeografskih analizah smo uporabili tri genetske markerje: prvo podenoto citokromske oksidaze (COI) in medgenski regiji v rRNA operonu (ITS1 in ITS2). V proučevanih taksonih nismo zasledili razlik v dolžini pomnoženega fragmenta COI (655 bp). Razlike v dolžini smo ugotovili v regijah ITS. Najdaljše regije ITS in velik dolžinski polimorfizem smo našli pri meroplanktonskih uhatih in velikih klobučnjakih (767-843 bp), holoplanktonske mesečinke imajo krajše regije ITS brez dolžinskega polimorfizma (645 bp). Največjo raznolikost v haplotipih COI smo ugotovili pri holoplanktonskih mesečinkah, medtem ko imajo meroplanktonski uhati in veliki klobučnjaki nižjo haplotipsko raznolikost COI ($0,958 > 0,921 > 0,910$). V regijah ITS pa smo odkrili največjo haplotipsko ($0,952$) in nukleotidno ($0,134$) raznolikost v vzorcih uhatih klobučnjakov. S filogeografskimi analizami na osnovi regij COI, ITS1 in ITS2 smo v evropskih morjih odkrili različne filogeografske vzorce klobučnjaških meduz. Holoplanktonske mesečinke nimajo močno podprte genetske in geografske strukture populacij v Sredozemskem morju in severnem Atlantskem oceanu. Nasprotno je pri uhatem klobučnjaku filogeografska analiza z vsem tremi markerji pokazala močno podprto genetsko strukturiranost glede na geografska območja. Razlike v nukleotidnih zaporedjih med posameznimi filogenetskimi skupinami so zelo velike ($> 10\%$), tako visoki deleži razlik nakazujejo na možne kriptične vrste znotraj rodu *Aurelia*. Filogeografska analiza z markerjem COI je odkrila slabo podprto strukturiranosti populacij velikega klobučnjaka na območju Sredozemskega morja. Analize regij ITS1/ITS2 ne kažejo geografske strukturiranosti – vsi haplotipi iz Sredozemskega morja se razvrstijo v eno močno podprto filogeografsko skupino. Naši rezultati skupaj z rezultati ostalih raziskovalcev nakazujejo, da so pri klobučnjaških meduzah filogeografski vzorci verjetno vezani na značilnosti življenjskega cikla – velike genetsko enotne populacije v holoplanktonskih in več geografsko strukturiranih kladov v meroplanktonskih vrstah.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
 DC UDC: 575.17:577.2:593.73(043.3)=163.6
 CX scyphozoan jellyfish/ mauve stinger - *Pelagia noctiluca*/ moon jelly - *Aurelia aurita*// barrel jellyfish - *Rhizostoma pulmo*/ mitochondrial and nuclear markers/ DNA sequences/ COI/ ITS1/ ITS2/ genetic diversity/ phylogeography
 CC
 AU STOPAR, Katja
 AA RAMŠAK, Andreja (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Postgraduate Study in Biological and Biotechnological Sciences, science discipline Genetics
 PY 2011
 TI GENETIC DIFFERENTIATION OF SCYPHOZOAN JELLYFISH REVEALED BY ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL AND NUCLEAR GENETIC MARKERS
 DT Doctoral Dissertation
 NO XII, 92 p., 14 tab., 22 fig., 3 ann., 252 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB In European seas and worldwide little is known about genetic diversity of scyphozoan jellyfish. In this respect, the aim of research was to evaluate the phylogeographic structure of selected scyphozoan species in European seas. Medusae of mauve stinger (*Pelagia noctiluca*), barrel jellyfish (*Rhizostoma pulmo*) and moon jelly (*Aurelia aurita*) were sampled in different geographic regions of the Mediterranean and Black Sea, north Atlantic Ocean, North and Baltic Sea. In phylogeographic analyses of selected scyphozoan jellyfish we used three genetic markers: cytochrome oxidase subunit one (COI) and intergenic regions of rRNA operon (ITS1 and ITS2). Sequence analyses of partial COI region revealed no indels and length polymorphism (655 bp) in all three species. Higher variability between species was found in ITS regions. The longest ITS regions with high rate of length polymorphism were in meroplanktonic barrel jellyfish and moon jelly (767-843 bp), whereas in mauve stinger ITS regions were shortest and very uniform with no length polymorphism (645 bp). Mauve stinger has higher haplotype diversity than meroplanktonic barrel jellyfish and moon jelly (0,958 > 0,921 > 0,910, respectively). The highest haplotype (0,952) and nucleotide (0,134) diversity in ITS regions was found in moon jelly. Phylogeographic analyses with COI, ITS1 and ITS2 markers revealed different patterns of genetic structuring of taxons among scyphozoans in European seas. Analysis in holoplanktonic mauve stinger revealed no genetic and geographic population structuring in Mediterranean Sea and North Atlantic Ocean. On the other hand in moon jelly high genetic structuring according to geographic regions was observed. Sequence difference among phylogenetic groups is very high (> 10%), so high percentage of difference suggesting new cryptic species in genus *Aurelia*. In barrel jellyfish the phylogeographic analyses with COI marker revealed weak structure in the Mediterranean Sea. Analysis with ITS1 and ITS2 markers revealed no structuring of populations – all haplotypes from the Mediterranean Sea are grouped in one strong supported phylogeographic group. Our results together with the other scyphozoan studies results indicate that shape of scyphozoan jellyfish phylogeographic patterns are probably dependent on life-cycle characteristics – bigger genetic homogeneous populations in holoplanktonic and many geographically structured clads in meroplanktonic species.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	X
Okrajšave, simboli, slovarček	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KLOBUČNJAŠKE MEDUZE	3
2.1.1 Množična pojavljanja klobučnjaških meduz	4
2.2 SISTEMATIKA KLOBUČNJAŠKIH MEDUZ	6
2.2.1 Mesečinka (<i>Pelagia noctiluca</i>)	7
2.2.2 Uhati klobučnjak (<i>Aurelia aurita</i>)	8
2.2.3 Veliki klobučnjak (<i>Rhizostoma pulmo</i>)	9
2.3 GENETSKI MARKERJI	10
2.3.1 Mitohondrijski markerji	10
2.3.2 Jedrni markerji	12
2.4 MOLEKULARNA FILOGENETIKA	14
2.4.1 Metode za izdelavo filogenetskih dreves	14
2.4.2 Filogenetska drevesa	14
2.5 FILOGEOGRAFIJA	15
2.5.1 Dejavniki , ki vplivajo na filogeografske vzorce	16
2.5.2 Filogeografske raziskave klobučnjaških meduz	17
2.5.2.1 Filogeografske raziskave uhatega klobučnjaka	18
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 VZORČEVANJE	19
3.2 METODE DELA	21
3.2.1 Izolacija genomske DNA	21
3.2.1.1 Protokol CTAB	21
3.2.1.2 Protokol za DNeasy Blood and Tissue Kit	22
3.2.1.3 Protokol z magnetnimi delci	23
3.2.1.4 Protokol Chelex 100	24
3.2.1.5 Razgradnja RNA v vzorcih genomske DNA	24
3.2.2 Merjenje koncentracije DNA	25
3.2.3 Agarozna elektroforeza	25

3.2.4	Pomnoževanje in določanje nukleotidnega zaporedja mitohondrijskih in jedrnih markerjev	25
3.2.4.1	Pomnoževanje mitohondrijskega markerja (regija COI)	26
3.2.4.2	Pomnoževanje markerjev ITS1, ITS2, 28S in 12S rDNA	27
3.2.4.3	Čiščenje produktov PCR, določevanje in sestavljanje nukleotidnih zaporedij	28
3.2.5	Analize nukleotidnih zaporedij	28
3.2.5.1	Iskanje podobnih nukleotidnih zaporedij v podatkovnih bazah	28
3.2.5.2	Poravnava zaporedij	29
3.2.5.3	Filogenetske analize	29
3.2.5.4	Mreže haplotipov	31
3.2.5.5	Analize nukleotidnih zaporedij in populacijsko genetske analize	32
4	REZULTATI	34
4.1	OPTIMIZACIJA IZOLACIJE DNA IZ TKIVA MEDUZ	34
4.2	VARIABILNOST NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ	37
4.3	GENETSKA DIFERENCIACIJA V MESEČINKI (<i>Pelagia noctiluca</i>)	39
4.4	GENETSKA DIFERENCIACIJA V UHATEM KLOBUČNJAKU (<i>Aurelia aurita</i>)	46
4.5	GENETSKA DIFERENCIACIJA V VELIKEM KLOBUČNJAKU (<i>Rhizostoma pulmo</i>)	55
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	60
5.1	PRIMERJAVA GENETSKE DIFERENCIACIJE V HOLOPLANKTONSKIH IN MEROPLANKTONSKIH KLOBUČNJAŠKIH MEDUZAH	60
5.1.1	Genetska diferenciacija v holoplanktonskih klobučnjaških meduzah	61
5.1.2	Genetska diferenciacija v meroplanktonskih klobučnjaških meduzah	64
5.2	SKLEPI	72
6	POVZETEK	73
6.1	POVZETEK	73
6.2	SUMMARY	74
7	VIRI	77
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Pregled filogeografskih raziskav klobučnjaških meduz.	17
Preglednica 2: Mesečinka – raznolikost v nukleotidnih zaporedjih COI in ITS glede na geografske regije.	40
Preglednica 3: Mesečinka – parne Φ_{ST} vrednosti med geografskimi regijami na osnovi 10000 permutacij.	44
Preglednica 4: Prostorska analiza molekulske variance (SAMOVA) za $K = 2,3,4$ alternativna grupiranja geografskih območij...	44
Preglednica 5: Mesečinka - testi nevtralnosti za nukleotidna zaporedja COI in ITS.	46
Preglednica 6: Uhati klobučnjak – raznolikost v nukleotidnih zaporedjih COI in ITS glede na geografska območja.	47
Preglednica 7: Uhati klobučnjak – raznolikost v nukleotidnih zaporedjih ITS1 in ITS2 glede na geografska območja.	48
Preglednica 8: Uhati klobučnjak - parne Φ_{ST} vrednosti med geografskimi območji na osnovi 10000 permutacij.	53
Preglednica 9: Razlike v nukleotidnih zaporedjih COI in ITS med linijami v rodu <i>Aurelia</i> : <u>pod diagonalo</u> % razlik v nukleotidnih zaporedjih COI, <u>nad diagonalo</u> % razlik v nukleotidnih zaporedjih ITS.	54
Preglednica 10: Uhati klobučnjak - testi nevtralnosti za nukleotidna zaporedja COI in ITS.	55
Preglednica 11: Veliki klobučnjaki – raznolikost v nukleotidnih zaporedjih COI in ITS glede na geografska območja.	56
Preglednica 12: Veliki klobučnjak - parne Φ_{ST} vrednosti med geografskimi regijami na osnovi 10000 permutacij.	59
Preglednica 13: Veliki klobučnjak - testi nevtralnosti za nukleotidna zaporedja COI in ITS.	59
Preglednica 14: Pregled kriptičnih linij/vrst v rodu <i>Aurelia</i> iz evropskih morij in povzetek uporabljenih genetskih markerjev.	65

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Življenjski cikel klobučnjakov (Arai, 1997).	3
Slika 2: Množična pojavljanja klobučnjaških meduz: A – letalski posnetek oblaka meduz uhatega klobučnjaka na morski gladini (foto: Boris Šuligoj), B – množični pojav meduz uhatega klobučnjaka (foto: Tihomir Makovec)...	5
Slika 3: Mesečinka (<i>Pelagia noctiluca</i>): A – meduza (foto: Tihomir Makovec), B – efira (foto: Tjaša Kogovšek).	7
Slika 4: Uhati klobučnjak (<i>Aurelia aurita</i>): A – meduza (foto: Tihomir Makovec), B – efira (foto: Tjaša Kogovšek), C – polipi (foto: Tihomir Makovec).	8
Slika 5: Veliki klobučnjak (<i>Rhizostoma pulmo</i>): A – meduza (foto: Jernej Sedmak), B – efira (foto: Valentina Turk).	10
Slika 6: Organizacija mitohondrijskega genoma uhatega klobučnjaka (Shao in sod., 2006).	11
Slika 7: Geni za ribosomalne RNA uhatega klobučnjaka (Ki in sod., 2009).	13
Slika 8: Zemljevid Sredozemskega morja in severnega Atlantskega oceana z označenimi mesti vzorčevanja za mesečinke (A), uhate klobučnjake (B) in velike klobučnjake (C)...	20
Slika 9: Primerjava izolacij DNA iz desetih mesečink: (A) z metodo CTAB, (B) z metodo DNeasy Blood and Tissue Kit, (C) z metodo Chelex 100, (D) z metodo Wizard Magnetic DNA Purification System for Food...	35
Slika 10: Primerjava izolacij fragmentov DNA iz tkiv desetih mesečink z metodo DNeasy Blood and Tissue Kit: (A) brez dodatka RNaze A, (B) po dodatku RNaze A...	36
Slika 11: Primerjava kvalitete fragmentov DNA iz sedmih osebkov odraslih mesečink po izolaciji z metodo DNesy Blood and Tissue Kit in dodatkom RNaze A: (A) iz 25 mg vzorca liofilizirane meduze, (B) iz 25 mg tkiva...	37
Slika 12: Število substitucij – tranzicij (Xs) in transverzij (Δv) – glede na genetske razdalje med haplotipi...	38
Slika 13: Mesečinka – filogenetsko drevo rekonstruirano z Bayesovim statističnim pristopom na osnovi nukleotidnih zaporedij COI in evolucijskega modela K81uf+G...	41
Slika 14: Filogenetski odnosi pri mesečinki rekonstruirani z Bayesovim statističnim pristopom na osnovi nukleotidnega zaporedja ITS in evolucijskega modela K80...	42
Slika 15: "Median-joining" mreža ($\epsilon = 0$) haplotipov COI iz klada II. Velikosti krogov so v sorazmerju s frekvenco haplotipov. Barve krogov označujejo geografski izvor haplotipov...	43

	str.
Slika 16: Razporeditvi neujemanj za celoten set haplotipov COI (A) in ITS (B) ter razporeditvi neujemanj haplotipov COI v kladu I (D) in kladu II (C)...	45
Slika 17: Uhati klobučnjak - filogenetsko drevo rekonstruirano z Bayesovim statističnim pristopom na osnovi združenih nukleotidnih zaporedij COI-ITS1-ITS2 in evolucijskega modela HKY+I+G (COI) ter TVMef+G (ITS)...	50
Slika 18: Uhati klobučnjak – filogenetsko drevo rekonstruirano z Bayesovim statističnim pristopom na osnovi nukleotidnih zaporedij COI in evolucijskega modela HKY+I+G...	51
Slika 19: Mreža haplotipov COI uhatega klobučnjaka po kriteriju varčnosti. Velikosti krogov so v sorazmerju s frekvenco haplotipov. Obarvanost krogov označuje geografski izvor haplotipov...	52
Slika 20: Veliki klobučnjak – filogenetski drevesi rekonstruirani z Bayesovim statističnim pristopom na osnovi: <u>levo</u> nukleotidnih zaporedij ITS (evolucijski model K80), <u>desno</u> nukleotidnih zaporedij COI (evolucijski model K81uf+G)...	57
Slika 21: Mreža haplotipov COI velikega klobučnjaka po kriteriju varčnosti. Velikosti krogov so v sorazmerju s frekvenco haplotipov. Obarvanost krogov označuje geografski izvor haplotipov...	58
Slika 22: Simulacija migracije meduz iz vrst rodu <i>Aurelia</i> z globalnim Lagrangianovim modelom upoštevajoč številne fizikalno-oceanografske in biološke parametre...	67

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Seznam osebkov klobučnjaških meduz glede na mesto vzorčevanja in haplotipov s pripadajočo kodo iz zbirke GenBank.
- Priloga B: Poravnave nukleotidnih zaporedij COI, ITS1, ITS2.
- Priloga C: Rekonstrukcija filogenetskih odnosov v rodu *Aurelia*.

OKRAJŠAVE, SIMBOLI, SLOVARČEK

A	adenin
AK	aminokislina
AMOVA	analiza molekulske variance (angl. Analysis of MOlecular VAriance)
angl.	angleško
BLAST	angl. Basic Local Alignment Search Tool
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin (angl. Bovine Serum Albumine)
C	citozin
COI	prva podenota citokromske oksidaze
CTAB	cetil trimetil amonijev bromid
dH ₂ O	destilirana voda
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksi nukleotid trifosfat
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina – dinatrijeva sol
ENC	efektivno število kodonov (angl. Effective Number of Codons)
G	gvanin
g	gravitacijski pospešek
gDNA	genomska DNA
<i>h</i>	haplotipska raznolikost
haplotip	specifično zaporedje DNA na točno določenem odseku genoma
HCl	klorovodikova kislina
IBD	izolacija zaradi oddaljenosti (angl. Isolation By Distance)
ITS	notranja prepisana regija (angl. Internal Transcribed Spacer)
K80	Kimurin model nukleotidne evolucije (1980)
MBP	Morska biološka postaja Piran
MCMC	angl. Markov Chain Monte Carlo
MgCl ₂	magnezijev klorid
ML	angl. Maximum likelihood
MP	angl. Maximum parsimony
mtDNA	mitohondrijska DNA
NaCl	natrijev klorid

NaOH	natrijev hidroksid
N_e	efektivna velikost populacije
OTE	obravnavane taksonomske enote
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
<i>Pfu</i>	polimeraza izolirana iz <i>Pyrococcus furiosus</i>
π	nukleotidna raznolikost
rDNA	ribosomska DNA
RNA	ribonukleinska kislina
RNaza A	encim RNA endonukleaza
SDS	natrijev dodecil sulfat
SAMOVA	Prostorska analiza molekulske variance (angl. Spatial Analysis of MOlecular VAriance)
T	timin
TAE	Tris-acetat-EDTA
<i>Taq</i>	polimeraza izolirana iz <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA pufer
TN93	model nukleotidne evolucije po Tamura in Nei (1993)
topologija	vejitveni vzorec
"touch down" PCR	PCR protokol, kjer v začetnih ciklih postopno znižujemo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov
"touch up" PCR	PCR protokol, kjer v začetnih ciklih postopno zvišujemo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
U	encimska enota
UV	ultravijoličen
www	svetovni splet (angl. World Wide Web)

1 UVOD

V obalnih območjih po vsem svetu so opažena vedno pogostejša množična pojavljanja meduz iz razreda klobučnjakov. V evropskih morjih so poznana številna množična pojavljanja meduz velikih klobučnjakov (*Rhizostoma pulmo*), uhatih klobučnjakov (*Aurelia aurita*) in mesečink (*Pelagia noctiluca*). Veliki in uhati klobučnjak sta po načinu življenja meroplanktonski vrsti in prisotni v obalnem morju. Mesečinka je holoplanktonska vrsta, ki nima polipov in jo najdemo tako v obalnem kot tudi v globljem ter odprtem morju.

Klobučnjaki (Medusozoa: Scyphozoa: Cnidaria) imajo razmeroma enostavno zgradbo telesa in za razločevanje vrst je na voljo malo morfoloških taksonomskih znakov. Težave pri identifikaciji vrst, kjer je diagnostičnih znakov za razlikovanje med vrstami zelo malo, lahko razjasnimo z uporabo molekularnih metod. Primerjanje informacij iz nukleotidnega zaporedja mitohondrijske in/ali jedrne DNA je preprosta, učinkovita in zelo priljubljena molekularna metoda. Potencialno primerna zaporedja so številna in imajo v genomu raznolike funkcije ter nukleotidno sestavo (introni, eksoni, nekodirajoča zaporedja, mikrosateliti, itd.). Zaporedja so bolj ali manj evolucijsko ohranjena, zato v skladu z namenom raziskave izberemo zaporedje z najprimernejšimi lastnostmi. Mitohondrijska DNA je v raziskavah živalskih populacij zelo priljubljena, ker je njena izolacija razmeroma preprosta in učinkovita, ima relativno visoko frekvenco mutacij in maternalno dedovanje. Mitohondrijsko nukleotidno zaporedje prve podenote citokromske oksidaze (COI) je najbolj pogosto uporabljen genetski marker v filogenetskih raziskavah višjih metazojskih skupin (Hebert in sod., 2003). V jedrnem genomu se za filogenetske analize pogosto uporabljajo nukleotidna zaporedja med geni za ribosomalne RNA (ITS1 in ITS2). Za ugotavljanje vzorcev prostorske genetske raznolikosti pa filogenetske analize dopolnimo s filogeografsko analizo.

Odnosi med posameznimi razredi znotraj debela ožigalkarjev so kljub filogenetskim raziskavam še vedno dvoumni, ker obstaja več različnih razlag sorodnosti med razredi. Različne filogenetske študije so med glavnimi skupinami ožigalkarjev potrdile, da lahko razdelimo deblo ožigalkarjev na dve poddebli Anthozoa (koralnjaki) in Medusozoa; poddeblo Medusozoa vključuje trdoživnjake, klobučnjake, kubomeduze in staurozoje (Collins, 2002). Na nivoju vrst je pri klobučnjakih število filogenetskih študij zelo skromno, nekaj raziskav je bilo narejenih le pri redovih Semaestomeae in Rhizostomeae - korenousti klobučnjaki (Schroth in sod., 2002; Dawson in sod., 2005; Dawson 2005 a, b, d). Za posamezne rodove in vrste klobučnjakov pa skoraj ni objavljenih filogenetskih in filogeografskih študij. Raziskovalci so v vrsti uhati klobučnjak (*A. aurita*) po analizah nukleotidnih zaporedij mitohondrijske DNA in genov za ribosomalne RNA odkrili več kriptičnih linij (Dawson in Jacobs, 2001; Schroth in sod. 2002, Dawson in sod., 2005). Take filogenetske in filogeografske analize pa bi bilo nujno narediti pri vseh tistih rodovih klobučnjakov, kjer za identifikacijo vrst obstaja malo zanesljivih diagnostičnih morfoloških znakov. Npr. zaradi pomankanja zanesljivih diagnostičnih znakov je vprašljiva taksonomska razdelitev (Mayer, 1910; Kramp, 1961) v rodu *Rhizostoma* med vrstama *R. pulmo* in *R. octopus*, v rodu *Pelagia* med vrstami *P. noctiluca*, *P. cyanella* in *P. perla*, itd.

Glede na čedalje številčnejše in redno pojavljanje določenih vrst klobučnjaških meduz so raziskovalci proučili in izpostavili več dejavnikov, ki verjetno vplivajo na številčnost meduz: evtrofikacija obalnega morja, klimatske spremembe, prelov rib, številne umetne strukture v morju, ki so dodaten substrat za naselitev polipne generacije. Množični pojavi klobučnjaških

meduz imajo številne negativne učinke na človekove dejavnosti, ker otežijo ribolov, nekatere vrste klobučnjakov povzročajo neprijetne ožige, toksini meduz povzročajo pomore rib v akvakulturah, agregacije meduz lahko zamašijo dotok morske vode v elektrarnah in v obratih za razsoljevanje. Prav tako so pomembni in daljnosežni neposredni vplivi množičnega pojavljanja meduz na velikosti ribjih populacij. Meduze se hranijo z ribjimi jajčeci in larvami, kar posledično vodi v zmanjšanje ribjih populacij. Zaradi tega imajo ribiči manjši ulov, kar se v ribiški panogi odraža kot gospodarska škoda (Purcell in sod., 2007; Richardson in sod., 2009). Ker množična pojavljanja meduz klobučnjakov v današnjem času povzročajo vedno večjo škodo v gospodarstvu in turizmu, se v zadnjem času vse bolj pojavlja potreba po celostnem razumevanju ekologije meduz, kar vključuje tudi populacijske raziskave klobučnjakov. Poznavanje filogeografske strukture klobučnjaških meduz in polipov je vsekakor pomembno in nujno, da lahko razložimo znotrajvrstne odnose in dejavnike, ki omogočajo povezanost med geografskimi območji.

1.1 NAMEN DELA

V obdobjih množičnih pojavov klobučnjakov v različnih geografskih območjih Sredozemskega in Črnega morja, severnega Atlantskega oceana, Severnega in Baltskega morja so bile vzorčene klobučnjaške meduze (mesečinke – *P. noctiluca*, uhati klobučnjaki – *A. aurita* in veliki klobučnjaki – *R. pulmo*). Iz vzorcev meduznih tkiv smo izolirali genomsko DNA. V izbranih delih mitohondrijske in jedrne DNA smo opredelili polimorfizem nukleotidnih zaporedij. Izbrani deli DNA so dovolj polimorfni, da jih lahko uporabimo za genetske markerje v filogenetskih in filogeografskih analizah vzorčevanih klobučnjaških meduz.

Namen dela je opredeljen v naslednjih točkah:

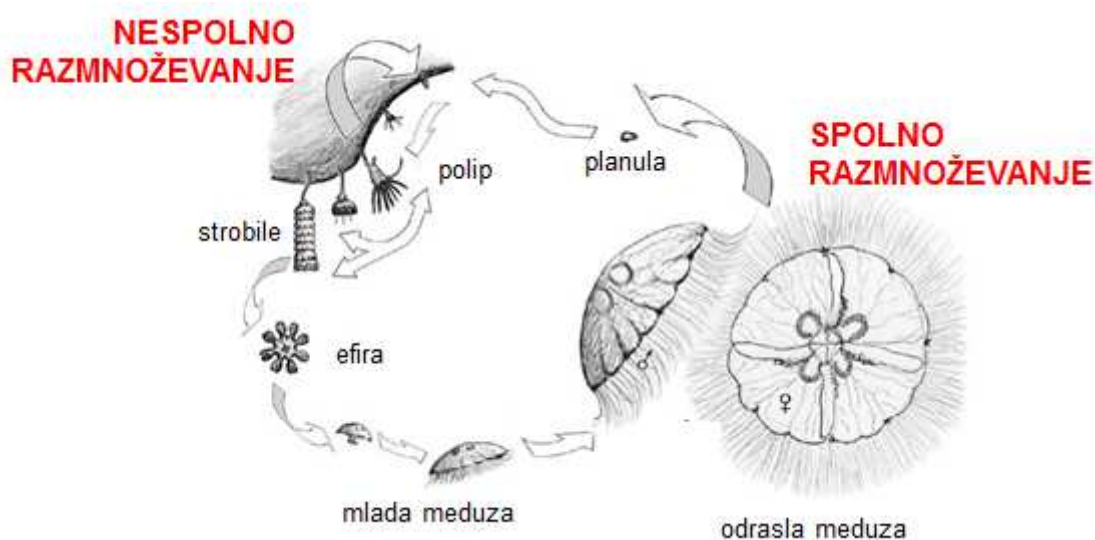
- (i) Ugotoviti filogeografsko strukturo mesečink, uhatih in velikih klobučnjakov v evropskih morjih; na osnovi razlik v nukleotidnih zaporedjih COI, ITS1 in ITS2 s filogenetskim pristopom znotraj posameznega taksona najprej ugotoviti genetsko raznolikost in sorodnost med populacijami z različnih geografskih območij. Glede na razvrstitev filogeografskih skupin opredeliti populacije ter vpliv hidrogeografskih pregrad na genski pretok med populacijami. Med geografsko bolj oddaljenimi mesti vzorčevanja pričakujemo višjo stopnjo genetske diferenciacije.
- (ii) Rezultate filogenetskih in filogeografskih analiz primerjati z razvrstitvijo vrst po taksonomski klasifikaciji klobučnjakov, ki je zasnovana na osnovi morfoloških znakov.
- (iii) Primerjati filogeografske vzorce treh taksonov klobučnjakov (mesečink, uhatih in velikih klobučnjakov) na območju evropskih morij ter izpostavili njihove posebnosti oz. skupne značilnosti.

Ugotavljanje filogeografske strukture mesečink in velikih klobučnjakov v evropskih morjih bo prva raziskava, ki bo opravljena na teh vrstah klobučnjakov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KLOBUČNJAŠKE MEDUZE

Večina klobučnjakov ima metagenetski življenjski cikel sestavljen iz plavajoče meduze (spolne) in pritrjene polipne (nespolne) generacije. Vrste, ki imajo metagenetski življenjski cikel, imenujemo meroplanktonske vrste. Po oploditvi se embrio razvije v plavajočo omigetalčeno ličinko (planulo), ki se pritrdi na primeren substrat in razvije v polip. V neugodnih razmerah se bazalni del polipa odcepi in obda s hitinom, tako nastane mirujoča oblika (podocista). V ugodnih razmerah se polipi razmnožujejo nespolno z brstenjem v nove polipe ali s strobilacijo v efire. Efire so plavajoče in se razvijejo v odraslo meduzo. Nekatere vrste so holoplanktonske, to so vrste brez polipne generacije. Dolžina življenjske dobe odraslih meduz se razlikuje od vrste do vrste, večinoma je v razponu od nekaj mesecev do enega leta. Obe generaciji imata potencial, da se lahko v zelo kratkem času izjemno namnožita. Odrasle meduze se večinoma ne pojavljajo čez celo leto, ampak je njihovo pojavljanje bolj sezonsko in takrat so običajno prisotne v izredno velikem številu. Prav zaradi težko predvidljivega pojavljanja so ekološke in filogeografske študije na klobučnjaških meduzah redke. Tako imamo za večino vrst klobučnjakov pomanjkljive podatke o pojavljanju, razširjenosti, populacijski dinamiki in ekologiji (povzeto po Arai, 1997).



Slika 1: Življenjski cikel klobučnjakov (Arai, 1997).

Figure 1: Life cycle of scyphozoans (Arai, 1997).

Klobučnjaki se prehranjujejo z raznovrstnim zooplanktonom: planktonskimi rakci, ličinkami nevretenčarjev, ribjimi jajčeci, larvami in mladnicami ter občasno tudi z efirami in meduzami drugih klobučnjakov in trdoživnjakov, rebračami (Purcell, 1991; Mills, 1995; Sabatés in sod., 2010). V neugodnih razmerah se meduze lahko hitro prilagodijo razmeram v okolju npr. če primanjkuje hrane, se velikost meduze zmanjša zaradi stradanja, nato v ugodnih razmerah

spet rastejo in ponovno dosežejo spolno zrelost (Russell, 1970; Hamner in Jenssen, 1974; Arai, 1997; Ishii in Båmstedt, 1998). Najpogostejši plenilci odraslih meduz so morske želve, priložnostno pa se z njimi hranijo tudi ptiči, sesalci in morske vetrnice (Ates, 1991; Fautin in Fitt, 1991; Omori in Nakano, 2001).

Meduze niso aktivni plavalci, premikajo jih morski tokovi. Vseeno pa niso povsem negibne, krčenje roba klobuka jim omogoča hranjenje ter lokalno horizontalno ali vertikalno migracijo (Mackie in sod., 1981; Hamner in sod. 1994; Purcell in sod., 2000; Dawson in Hamner, 2003). Tako preprosto gibanje potrebujejo za nastanek in vzdrževanje lokalnih agregacij meduz, ki so pogoj za uspešno reprodukcijo.

2.1.1 Množična pojavljanja klobučnjaških meduz

Opazovanja v zadnjih dveh desetletjih kažejo na globalni trend pogostejšega množičnega pojavljanja želatinoznega planktona - meduze ožigalkarjev in rebrače (UNEP, 1991; CIESM 2001; Uye in sod., 2003; Xian in sod., 2005; Purcell in sod., 2007; Gibbons in Richardson, 2009; Baxter in sod., 2010; Fuentes in sod., 2010; Vladymyrov in sod., 2011). Ali množična pojavljanja nastajajo le lokalno ali so posledica večanja izvornih populacij, ki se širijo v obalna območja bolj ali manj skoraj vseh morij, še ni pojasnjeno.

Raziskovalci sklepajo, da biotske in abiotske spremembe v morskih ekosistemih, ki so predvsem posledica številnih človeških aktivnosti in globalnih klimatskih sprememb, posredno vplivajo na pogostejša množična pojavljanja klobučnjaških meduz (Slika 2). Človeške aktivnosti (turizem, ribištvo, onesnaževanje) so povzročile spremembe, ki ugodno vplivajo na številčnost populacij meduz. Onesnaževanje lahko prispeva k eutrofikaciji obalnih ekosistemov in intenzivna ribiška dejavnost povzroča prelov ribjih populacij (Arai, 2001; Mills, 2001; Purcell in sod., 1999; Purcell, 2005; Purcell in sod., 2007; Richardson in sod., 2009). Poleg antropogenih vplivov pa naj bi na številčnost populacij meduz ugodno vplivali tudi spremenjeni okoljski dejavniki (klimatske spremembe z dvigom temperature, spremembe slanosti in pH) (Dawson in sod., 2001; Purcell, 2005; Brodeur in sod., 2008; Richardson in Gibbons, 2008; Richardson in sod., 2009). Spremembe okoljskih dejavnikov omogočajo ugodnejše pogoje za preživetje meduz, verjetno pa tudi stimulirajo večjo produkcijo polipov in efir (Purcell, 2005; Holst in Jarms, 2007; Liu in sod., 2009). Poleg vsega človeški posegi v morski ekosistem (smeti in podvodne gradbene strukture) hkrati nudijo nove ugodne substrate za polipe (Miyake in sod., 2002; Holst in Jarms, 2007; Hoover in Purcell, 2009). Gotovo pa k večanju števila podatkov o množičnih pojavljanjih klobučnjaških meduz poleg antropogenih in okoljskih dejavnikov prispevajo tudi nove izpopolnjene metode monitoringa (Houghton in sod., 2006; Baxter in sod., 2010). Človeške aktivnosti imajo praviloma pozitiven učinek na množična pojavljanja meduz, ravno nasprotno pa imajo množična pojavljanja meduz negativne posledice na človeške dejavnosti (turizem, ribištvo, ribogojnice, elektrarne). Tako je v zadnjem času mogoče zaslediti vedno več poročil, ki poročajo o problemih in gospodarski škodi, ki nastaja zaradi množičnega pojavljanja meduz (Burnett, 1991; Lynam in sod., 2006; Purcell in sod., 2007; Doyle in sod., 2008) in razprav o dejanski vlogi klobučnjaških meduz v morskem ekosistemu (Hay, 2006; Attrill in sod., 2007; Boero in sod., 2008; Pauly in sod., 2009; Richardson in sod., 2009).



Slika 2: Množična pojavljanja klobučnjaških meduz: A – letalski posnetek oblaka meduz uhatega klobučnjaka na morski gladini (foto: Boris Šuligoj), B – množični pojav meduz uhatega klobučnjaka (foto: Tihomir Makovec), C – večina ulova v ribiški mreži so meduze velikega klobučnjaka (foto: Robert Radolović).

Figure 2: Massive outbreaks of scyphozoans: A – airplane picture of moon jelly bloom at sea level (foto: Boris Šuligoj), B – bloom of moon jelly (foto: Tihomir Makovec), C – most of the catch in fishing net are medusae of barrel jellyfish (foto: Robert Radolović).

V evropskih morjih se zelo pogosto množično pojavljajo klobučnjaške meduze mesečink (*Pelagia noctiluca*), uhatih klobučnjakov (*Aurelia aurita*) in velikih klobučnjakov (*Rhizostoma pulmo*) (UNEP, 1991; CIESM, 2001; Doyle in sod., 2008; Licandro in sod., 2010; Nastasi, 2010). Množični pojavi mesečinke so bili v zadnjih desetletjih zabeleženi v Sredozemskem morju in severnem Atlantskem oceanu (UNEP, 1991; CIESM, 2001; Doyle in sod., 2008; Baxter in sod., 2010; Daly Yahia in sod., 2010; Licandro in sod., 2010). V Sredozemskem morju so množična pojavljanja v zadnjih 100 letih natančno zabeležili in preučili Goy in sodelavci (1989). Za območje Jadranskega morja so v zadnjih 100 letih zabeležena tri obdobja množičnega pojavljanja: 1910–1914, 1976–1986 in 2004–2007 (Kogovšek in sod., 2010). V bolj zaprtih obalnih območjih vseh evropskih morij se v izredno velikem številu pojavljajo meduze uhatih klobučnjakov (Schneider in Behrends, 1994; CIESM, 2001; Kideys, 2002; Lynam in sod., 2004; Nastasi, 2010). Stalna populacija meduz uhatega klobučnjaka je v slanem Velikem jezeru na otoku Mljet (Benović in sod., 2000; CIESM 2001). Množična pojavljanja velikega klobučnjaka so zabeležili v Sredozemskem (vključno z Jadranskim morjem) in Črnem morju (Morand in Dallot, 1985; CIESM, 2001; Kideys, 2002; Nastasi, 2010). Poročajo tudi o pojavljanju velikih klobučnjakov v Indijskem oceanu (Muhammed in Sultana, 2007). Stalna populacija velikega klobučnjaka je v zadnjih dveh desetletjih prisotna v španski laguni Mar Menor (Perez-Ruzafa in sod., 2002; Fuentes in sod., 2011). V severnih evropskih morjih pa se množično pojavljajo meduze vrste *Rhizostoma octopus* (Lilley in sod., 2009).

2.2 SISTEMATIKA KLOBUČNJAŠKIH MEDUZ

Deblo: ožigalkarji – Cnidaria (Hatschek, 1988)
 Poddeblo: Medusozoa (Petrsen, 1979)
 Razred: klobučnjaki – Scyphozoa (Goette, 1887)

Ožigalkarji so stara, preprosta in zelo raznolika skupina živali. Vsem je skupno, da imajo ožigalke (Hessinger in Lenhoff, 1988). Deblo ožigalkarjev sestavlja pet razredov: koralnjaki (Anthozoa), trdoživnjaki (Hydrozoa), kubomeduze (Cubozoa), klobučnjaki (Scyphozoa) in stavrozoi (Staurozoa) (Dunn, 1982). Glede na filogenetske anize deblo ožigalkarjev nadalje razdelimo na dva monofiletska klada – Anthozoa in Medusozoa (Bridge in sod., 1992, Collins 2002). V klad Medusozoa uvrščamo stavrozoe, trdoživnjake, kubomeduze in klobučnjake. Predstavnikom Medusozoa je skupno, da imajo podobno strukturo mitohondrijskega genoma in da določeno obdobje življenjskega cikla preživijo v obliki meduze (Daly in sod., 2007).

Sistematika klobučnjaških meduz temelji na opisih raziskovalcev iz prejšnjega stoletja (Mayer, 1910; Kramp, 1961; Russell, 1970). Novejši pregleden in zgoščen taksonomski povzetek klobučnjakov in kubomeduz sta objavila Mianzan in Cornelius (1999). Po njihnih podatkih razred klobučnjakov sestavlja približno 200 morfoloških vrst. Od ostalih predstavnikov Medusozoa se razlikujejo po večkratni prečni delitvi polipa (strobilaciji), prisotnosti ropalijev in efir.

Klobučnjaki imajo zelo velik potencial morfološke (Lucas, 2001; Dawson, 2003; Bolton in Graham, 2004; Dawson, 2005a) in ekološke prilagodljivosti (Lesh-Laurie in sod., 1991; Greenberg in sod., 1996; Dawson in Martin, 2001; Dawson in Hammner, 2003), kar posledično v tradicionalni taksonomiji povzroča veliko težav. Zato je v zadnjem desetletju mogoče zaslediti več predlogov novih opisov vrst (Dawson 2005 b, e; Gershwin in Collins, 2002), ki jih večinoma poleg natančnega opisa morfoloških znakov dopolnjujejo tudi molekularne analize. Razvoj molekularnih tehnik je omogočil, da lahko preverimo ujemanje morfoloških taksonomskih znakov z molekularnimi znaki. Molekularne raziskave tako odkrivajo vse več novih vrst v različnih taksonomskih skupinah in življenjskih okoljih (Knowlton, 1993; Bickford in sod., 2007), ki se med seboj na osnovi morfoloških znakov ne razlikujejo in so bile prej opisane kot ena nominalna vrsta, to so t.i. kriptične vrste. S filogenetskimi raziskavami so raziskovalci znotraj posameznih rodov klobučnjakov odkrili veliko kriptičnih vrst (Dawson in Jacobs, 2001; Schroth in sod., 2002; Holand in sod., 2004; Dawson in sod., 2005). Med morskimi organizmi pa so zasledili tudi določena neskladja, kot npr. morfološko raznoliki taksoni se genetsko skoraj ne razlikujejo (Bolton in Graham, 2004), medtem ko lahko kažejo morfološko podobni taksoni veliko genetsko raznolikost (Knowlton, 2000). Tako je verjetno ocena biodiverzitete klobučnjakov na osnovi klasičnih taksonomskih znakov zaradi pomankanja zanesljivih diagnostičnih znakov podcenjena (Dawson 2004 in 2005f). Treba je biti zelo pazljiv pri podajanju sklepov, če filogenetske raziskave ne dopolnjuje tudi skrbna morfološka analiza. Brez novih morfoloških raziskav pa zaenkrat vrste, ki so opisane le na osnovi filogenetskih raziskav, ostajajo kriptične (Holand in sod., 2004; Dawson in sod., 2005).

Na osnovi najnovejših filogenetskih raziskav razred klobučnjakov sestavljajo trije redovi (Coronatae, Rhizostomeae, Semaestomeae), Cubozoa (kubomeduze) in Staurozoa

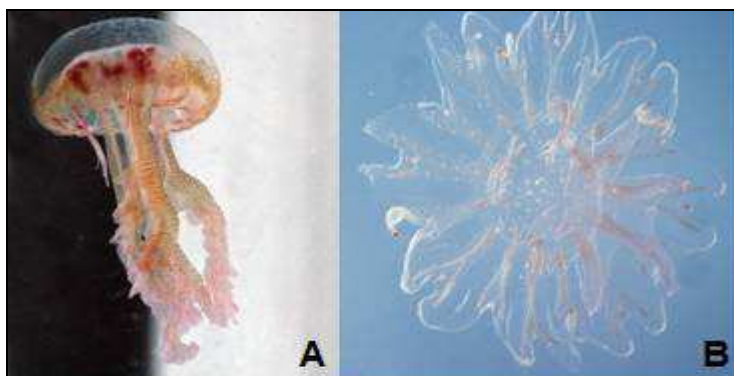
(stavrozoji) pa sta ločena razreda (Marques in Collins, 2004; Collins in sod., 2006; Daly in sod., 2007). Razred klobučnjakov se deli na dve monofiletski skupini: Coronatae in Discomedusae (slednja vključuje Semaestomeae in Rhizostomeae). Semaestomeae so parafiletske glede na monofiletske Rhizostomeae (Collins, 2002; Dawson, 2004; Collins in sod., 2006; Bayha in sod., 2010).

2.2.1 Mesečinka (*Pelagia noctiluca*)

Razred: klobučnjaki - Scyphozoa
Podrazred: Discomedusae (Maas, 1907)
Red: Semaestomeae (Agassiz, 1862)
Družina: Pelagiidae (Gegenbaur, 1856)

V družino Pelagiidae se poleg rodu *Pelagia* (Peron in Lesueur, 1810) uvrščata še rodova *Chrysaora* in *Sanderia* (Kramp, 1961). Značilnosti meduz rodu *Pelagia* so 16 robnih krp, med katerimi se izmenjuje 8 ropalijev in 8 tentaklov, in 16 gastralnih žepov, ki se končujejo v kanalih gastrovaskularnega sistema. Taksonomska razvrstitev med raziskovalci ni poenotena in razrešena. Mayer (1910) je v rod *Pelagia* uvrstil 13 vrst: *P. noctiluca*, *P. cyanella*, *P. panopyra*, *P. flaveola*, *P. tahitiana*, *P. discoidea*, *P. denticulata*, *P. perla*, *P. phosphora*, *P. placenta*, *P. neglecta*, *P. crassa*, *P. minuta*. Kramp (1961) v rodu *Pelagia* priznava le eno vrsto – *P. noctiluca*, vse ostale vrste po Mayerju (1910) uvršča kot morfološke različice vrste *P. noctiluca*. Russell (1970) za območje otočja Velike Britanije navaja tri vrste: *P. noctiluca* (Forskål, 1775), *P. flaveola* (Eschscholtz, 1829) in *P. colorata* (Russell, 1964). Gershwin in Collins (2002) sta po morfološki analizi 20 taksonomskih znakov *P. colorata* razporedila v rod *Chrysaora* in jo preimenovala v *Chrysaora colorata*. Njuna primerjava med *P. noctiluca* in *P. flaveola* je pokazala, da je obarvanost edini izmed 20 taksonomskih znakov, ki ju razlikuje. Drugih razpoznavnih taksonomskih znakov za razlikovanje med vrstama ni, zato je večina sodobnih raziskovalcev predvsem naklonjena ureditvi po Krampu (1961) - ena nominalna vrsta (*P. noctiluca*), ki poseljuje topla in zmerno-topla morja.

P. noctiluca je vrsta brez polipne generacije – holoplanktonska vrsta. Planula se preko vmesnih planktonskih stadijev razvije neposredno v efiro (Rottini Sandrini in Avian, 1983).



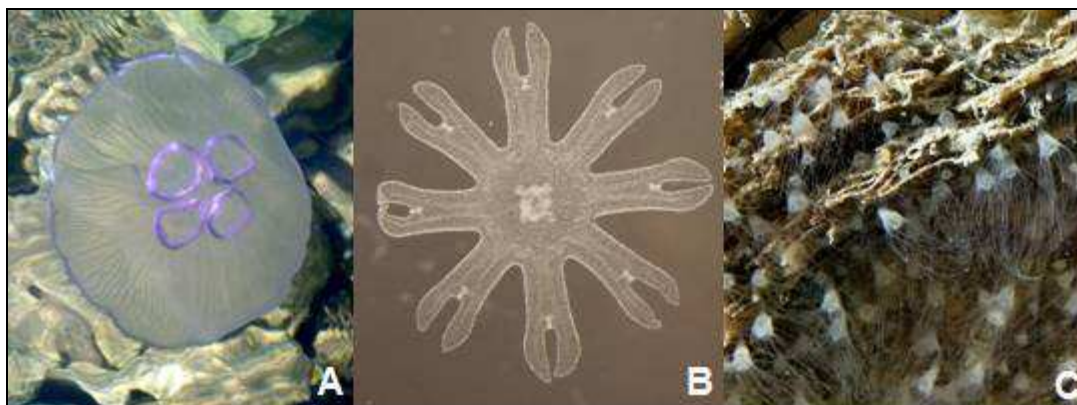
Slika 3: Mesečinka (*Pelagia noctiluca*): A – meduza (foto: Tihomir Makovec), B – efira (foto: Tjaša Kogovšek).

Figure 3: Mauve stinger (*Pelagia noctiluca*): A – medusa (photo: Tihomir Makovec), B – ephyra (photo: Tjaša Kogovšek).

2.2.2 Uhati klobučnjak (*Aurelia aurita*)

Razred: klobučnjaki - Scyphozoa
 Podrazred: Discomedusae (Maas, 1907)
 Red: Semaestomeae (Agassiz, 1862)
 Družina: Ulmaridae (Haeckel, 1879)
 Poddružina: Aureliinae (Agassiz, 1862)

V družino Ulmaridae je poleg rodu *Aurelia* (Péron in Lesueur, 1810) uvrščenih še 14 rodov (Kramp, 1961). Značilnosti meduz rodu *Aurelia* so številni tanki kratki tentakli na robu klobuka, ki je razdeljen na 8-16 plitkih in širokih robnih krp, ustna ramena v obliki stožca in radialnih kanalov, ki se vejijo in so povezani z anastomozami (Kramp, 1961). Mayer (1910) je 13 morfoloških različic v rodu *Aurelia* razvrstil v tri vrste: *A. aurita* (vključujoč *A. cruciata*, *A. colpota*, *A. flavidula*, *A. hyalina*, *A. dubia*, *A. vitiana*, *A. marginalis*), *A. labiata* (vključujoč *A. limbata*, *A. clausa*, *A. maldivensis*) in *A. solida*. Kramp (1961) navaja sedem vrst: *A. aurita* (Linnaeus, 1746), *A. labiata* (Chamisso in Eysenhardt, 1821), *A. solida* (Browne, 1905), *A. limbata* (Brandt, 1835), *A. colpota* (Brandt, 1838), *A. coerulea* (von Lendenfeld, 1884), *A. maldivensis* (Bigelow, 1904). Russell (1970) je za območje otočij Velike Britanije natančno opisal meduze *A. aurita*, v rod *Aurelia* pa je uvrstil dve vrsti: *A. limbata* (borealno-arktična vrsta) in *A. aurita* (kozmpolitska vrsta). Gershwin (2001) v rodu *Aurelia* predlaga drugačno taksonomsko razvrstitev na *A. aurita* in *A. labiata*. Predlagani taksonomski znaki za razlikovanje obeh vrst so širina in dolžina ustnega stožca, dolžina ustnih ramen, število radialnih kanalov in anastomoz ter število robnih krp na klobuku. *A. limbata* je po njenih trditvah le ena izmed različic *A. aurita*. V rodu *Aurelia* so s filogenetskimi raziskavami (Dawson in Jacobs, 2001; Schroth in sod., 2002; Dawson in sod., 2005) ugotovili, da se v vrsti *A. aurita* skriva več kriptičnih vrst (glej poglavje 2.5.2.1). Na podlagi filogenetskih dognanj je Dawson (2003) pripravil dopolnjen seznam diagnostičnih morfoloških znakov, ki naj bi služili za razločevanje vrst v rodu *Aurelia*.



Slika 4: Uhati klobučnjak (*Aurelia aurita*): A – meduza (foto: Tihomir Makovec), B – efira (foto: Tjaša Kogovšek), C – polipi (foto: Tihomir Makovec).

Figure 4: Moon jelly (*Aurelia aurita*): A – medusa (photo: Tihomir Makovec), B – ephyra (photo: Tjaša Kogovšek), C – polyps (photo: Tihomir Makovec).

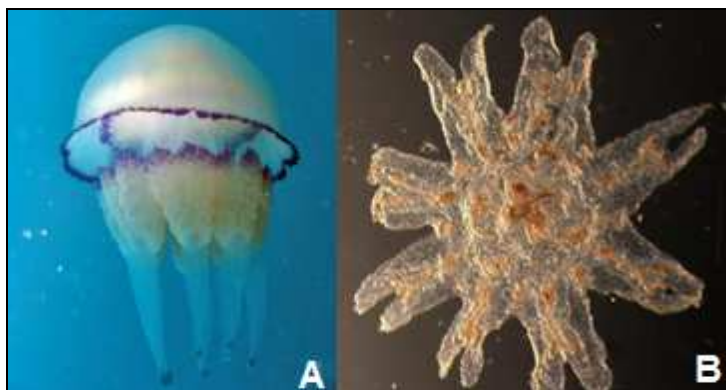
Vrste v rodu *Aurelia* imajo meduzno in polipno generacijo, so t.i. meroplanktonske vrste. Straehler-Pohl in Jarms (2010) sta natančno spremljala in opisala razvoj efir vrst *A. aurita* in *A. limbata*, vendar nista uspela določiti zanesljivih diagnostičnih znakov za razlikovanje med vrstama. Polipi imajo enostavno zgradbo telesa in jih je še težje ločiti glede na vrsto (Calder, 1971; Morales-Alamo in Haven, 1974). Do sedaj so v morju nahajališča polipov odkrili le v pristaniščih (Miyake in sod., 2002; Matsumura in sod., 2005; neobjavljeni podatki Morska biološka postaja Piran).

2.2.3 Veliki klobučnjak (*Rhizostoma pulmo*)

Razred:	klobučnjaki - Scyphozoa
Podrazred:	Discomedusae (Maas, 1907)
Red:	korenousti klobučnjaki – Rhizostomeae (Cuvier, 1799)
Podred:	Daktyliophorae (Stiasny, 1921)
Naddružina:	Scapulatae (Stiasny, 1921)
Družina:	Rhizostomatidae (Cuvier, 1799)

V družino Rhizostomatidae se poleg rodu *Rhizostoma* (Cuvier, 1799) uvrščajo še rodovi *Eupilema*, *Rhopilema* in *Nemopilema* (Kramp, 1961). Značilnosti meduz rodu *Rhizostoma* so majhne epotele na bazi ustnega stožca, paličasto oblikovani koničasti priveski na koncu ustnih ramen in dobro razvit gastrovaskularni sistem z velikim krožnim kanalom in številnimi stranskimi kanali (Russell, 1970). Mayer (1910) v rod *Rhizostoma* uvršča pet vrst: *R. pulmo*, *R. lutea*, *R. octopus*, *R. corona*, *R. capensis*. Taksonomska razvrstitev po Krampu (1961) navaja tri vrste: *R. pulmo* (Macri, 1778), *R. octopus* (Linnaeus, 1788) in *R. luteum* (Quoy in Gaimard, 1827). Russell (1970) v svoji razpravi, ki je osredotočena predvsem na opis vrst prisotnih v otočju Velike Britanije, v rodu *Rhizostoma* navaja isto razvrstitev vrst kot Kramp (1961). Verodostojnost taksonomske razdelitve na tri vrste med sodobnimi raziskovalci vzbuja pomisleke o obstoju vrste *R. luteum* ob obalah zahodne Afrike in jugozahodne Evrope, ki prekinja areal sorodnih vrst *R. pulmo* in *R. octopus*. Vrsti *R. pulmo* in *R. octopus* sta si zelo podobni, razlikujeta se le po številu robnih krp na klobuku meduze in območju razširjenosti. Vrsta *R. pulmo* ima na osmini klobuka osem robnih krp in je prisotna v Črnem in Sredozemskem morju. Vrsta *R. octopus* pa ima v povprečju deset robnih krp na osmini klobuka in se pojavlja ob severozahodni obali Evrope in Severnem morju (Russell, 1970). Holst in sodelavci (2007) so naredili nov opis morfoloških značilnosti vrste *R. octopus*. Natančno so opisali značilnosti planule, polipa, efire in mlade meduze, pri odraslih spolno dozorelih meduzah so med spoloma zasledili razlike v obarvanosti gonad. Paspaleff (1938) pri *R. pulmo* ne poroča o različni obarvanosti gonad.

Predstavniki rodu *Rhizostoma* imajo meduzno in polipno generacijo – meroplanktonske vrste. Efire vrst *R. pulmo* in *R. octopus* sta natančno opisala Straehler-Pohl in Jarms (2010), zanesljivih znakov za njuno identifikacijo nista mogla določiti. Morfološki opisi polipov so zelo redki (Paspaleff, 1938; Holst in sod., 2007; Fuentes in sod., 2011). Naravna nahajališča polipov niso poznana. Vse dosedanje raziskave so bile narejene le na polipih, ki so jih vzgajili v laboratoriju.



Slika 5: Veliki klobučnjak (*Rhizostoma pulmo*): A – meduza (foto: Jernej Sedmak), B – efira (foto: Valentina Turk).

Figure 5: Barrel jellyfish (*Rhizostoma pulmo*): A – medusa (photo: Jernej Sedmak), B – ephyra (photo: Valentina Turk).

2.3 GENETSKI MARKERJI

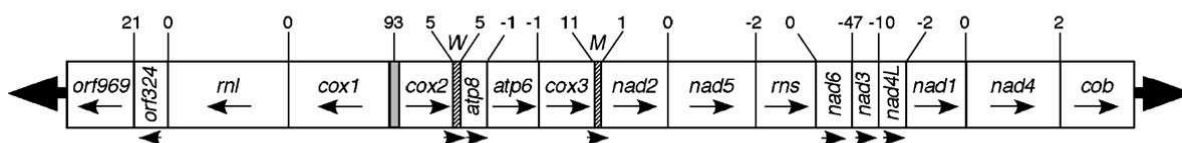
Genetski markerji so fragmenti DNA, ki jih uporabljamo za ugotavljanje raznolikosti dednega zapisa pri različnih stopnjah organizacije (celice, osebk, populacije, vrste). Za najbolj priljubljene in učinkovite genetske markerje veljajo tisti, ki so lahko določljivi in polimorfni. Množično se uporabljajo predvsem v medicinskih, forenzičnih in filogenetskih raziskavah. Glede na izvor fragmenta DNA ločimo mitohondrijske in jedrne markerje. Vsak genetski marker ima določene prednosti in omejitve, zato pri raziskavah glede na vrsto analize izberemo marker z ustreznimi lastnostmi dedovanja in polimorfizma (Zhang in Hewitt, 2003).

Za klobučnjaške meduze, ki jih obravnavamo v tej raziskavi, je znanih zelo malo genetskih markerjev. Iz predhodnih filogenetskih raziskav je objavljenih nekaj nukleotidnih zaporedij mtDNA in jedrne DNA uhatega klobučnjaka (Dawson in Jacobs, 2001; Schroth in sod., 2002; Dawson in sod., 2005; Ki in sod., 2008). Večinoma so to zapisi za delna zaporedja gena COI, 16S rDNA, 18S rDNA, ITS1, 5.8S, ITS2, 28S rDNA. Za mesečinko in velikega klobučnjaka smo prva nukleotidna zaporedja COI, ITS1 in ITS2 pridobili tekom te raziskave (Stopar in sod., 2010; Stopar in sod., 2011).

2.3.1 Mitohondrijski markerji

Mitohondriji imajo običajno v matriksu 5-10 molekul mtDNA. Evkariontska celica normalno vsebuje več sto mitohondrijev in tako je že v eni sami celici zelo veliko število mtDNA molekul. Če so v organizmu vse mtDNA molekule identične v nukleotidnem zaporedju, to stanje imenujemo homoplazmija. V primeru, da znotraj posameznega organizma zasledimo različne nukleotidne zapise mtDNA, temu stanju pravimo heteroplazmija. Običajno v mitohondrijskem genomu prevladuje homoplazmija, kar je dobro za filogenetske analize, drugače moramo pri analizah upoštevati določene omejitve zaradi pojava heteroplazmije (Avice, 2000).

Med vsemi klobučnjaki je edini v celoti poznan samo mitohondrijski genom uhatega klobučnjaka, ki obsega 16.937 bp (Shao in sod., 2006). Od mitohondrijskih genomov koralnjakov se razlikuje po obliki. Koralnjaki imajo krožno mtDNA, medtem ko imajo klobučnjaki linearno mtDNA, ki je razmeroma redka v živalskih mitohondrijskih genomih (Bridges in sod., 1992; Boore, 1999). V mtDNA uhatega klobučnjaka je zapis za 13 beljakovin, ki sodelujejo v dihalni verigi, malo in veliko podenoto ribosomalne RNA, 2 transportni RNA (tRNA za metionin in triptofan) in 2 zaporedji ORF. Geni so organizirani v dve skupini in vsaka skupina se prepisuje v svoji smeri. Prepisovanje poteka v smeri proti koncu molekule mtDNA, sprememba smeri prepisa se zgodi v 93 bp dolgi nekodirajoči regiji med genoma za COI in COII. Prvo zaporedje ORF je dolgo 969 bp in je zelo podobno zaporedju iz družine B DNA polimeraz, ki jih najdemo v linearni mtDNA protistov, rastlin in gliv. Gen za malo ribosomalno podenoto (*rns*) in gen za veliko ribosomalno podenoto (*rnl*) sta 7000 bp narazen in imata vsak svojo smer transkripcije (glej Slika 6). Taka ureditev ribosomalnih genov je relativno redka pri živalskih mitohondrijskih genomih, običajno ribosomalni geni ležijo skupaj in prepisovanje genov poteka v isti smeri. V krožni mtDNA koralnjakov so opazili relativno velike nekodirajoče regije, pri uhatem klobučnjaku pa le par kratkih medgenskih regij. Razen ožigalkarjev nobena druga skupina živalskih mitohondrijskih genomov ne vsebuje tujih genov. Med jedrnim in mitohondrijskim genomom ožigalkarjev je očitno večja izmenjava kot med ostalimi skupinami živali. Sklepajo, da bi temu lahko bil vzrok večja frekvenca nehomolognih rekombinacij kot pri ostalih živalih ali da mehanizem, ki transportira tRNA v mitohondrije, pomaga transportirati tudi drugo DNA (povzeto po Shao in sod., 2006).



Slika 6: Organizacija mitohondrijskega genoma uhatega klobučnjaka (Shao in sod., 2006).

Figure 6: Organisation of mitochondrial genome in moon jelly (Shao et al., 2006).

V filogenetskih študijah je pri živalskih taksonih najbolj priljubljen mitohondrijski genom. Mitohondrijska DNA (mtDNA) je priljubljena v raziskavah predvsem zaradi razmeroma preproste izolacije DNA, relativno visoke frekvenca mutacij in maternalnega dedovanja. Pri enostarševskem dedovanju ni rekombinacije in tako so razlike med osebki predvsem posledica kopičenja mutacij, selekcije in genetskega drifta. Zaradi nizke frekvenca rekombinacij so ocene genetske variabilnosti lahko tudi višje od primerljivih ocen jedrnih lokusov z večjim številom alelov. Taka velika variabilnost pa se odraža kot pomanjkljivost, ker zaradi hitre evolucije mtDNA lahko prihaja do konvergence, kar lahko vodi do napačne interpretacije filogenetskih in filogeografskih odnosov. Poleg tega je mitohondrijski genom pogosto podvržen večjemu genetskemu driftu kot jedrni genom, ker haploidno stanje zaradi enostarševskega dedovanja zmanjša efektivno velikost populacije. Iz tega izhaja, da je evolucija mtDNA načeloma lahko tudi do desetkrat hitrejša od jedrne DNA (Brown in sod., 1979; Avise in sod., 1987), seveda pa to ni absolutno dejstvo, saj na potek evolucije vplivajo tudi pretekli demografski procesi v populacijah (ekspanzije, učinki ozkega grla, kolonizacija, fragmentacija). Zhang in Hewitt (2003) sta primerjala hitrost evolucije v različnih mitohondrijskih in jedrnih markerjih in ugotovila, da evolucija v jedrni DNA ni vedno

počasnejša od mitohondrijske DNA. Za variabilnost mtDNA nukleotidnih zaporedij je dolgo časa veljalo, da je selektivno nevtralna (Ballard in Kreitman, 1995). Novejše raziskave pa nakazujejo, da razlike v mtDNA vplivajo na življenjske strategije in prilagoditveno sposobnost osebkov ter mitohondrijsko-jedrno koevolucijo (Dowling in sod., 2008).

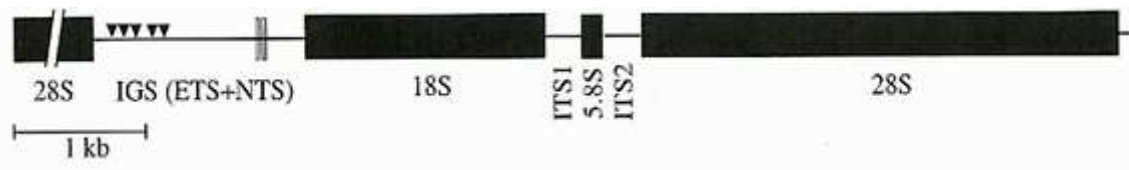
Maternalno dedovanje in odsotnost rekombinacije pomembno vpliva na evolucijo mtDNA in zato predpostavljamo, da vsi haplotipi mtDNA nakazujejo sled do skupnega prednika. Koalescenca je izraz, ki označuje tako združitev genetskih linij v preteklosti. Na tej predpostavki temelji koalescenčna teorija, ki jo podpira model nevtralne evolucije populacij. Na osnovi različnih metod se ocenjuje čas cepitve populacij (Edwards in Beerli, 2000). Variacije izhajajo le iz substitucij na različnih mestih zaporedja. Znotraj vrste so si linije mtDNA namreč zelo podobne in zaradi skupnega izvora ohranijo zapis, ki so ga imeli predniki. Bolj kot so si nukleotidna zaporedja organizmov podobna, krajši je čas do skupnega prednika, to je čas koalescence (Avice, 2000).

Za filogenetske raziskave se lahko uporablja celotno zaporedje mtDNA ali le posamezni odseki. Najpogosteje se v študijah uporabljajo zaporedja velike (16S) in male (12S) rDNA, prve podenote citokromske oksidaze (COI), citokroma b in D-zanke. Predvsem pri višjih metazojskih skupinah je regija COI med mtDNA eden izmed najbolj pogosto uporabljenih markerjev za molekularno identifikacijo (angl. DNA barcoding) (Hebert in sod., 2003; Frézal in Leblois, 2008; Ortman in sod., 2010). Erpenbeck in sod. (2005) so ugotovili, da je odsek na 5' koncu COI gena (t.i. 5' Folmerjev del) primeren za rekonstrukcijo nižje nivojskih odnosov (populacijske študije) pri višjih metazojih. Pri koralnjakih in spužvah je ta del preveč konzervativen in zato ni primeren za rekonstrukcijo odnosov znotraj populacij, ampak je za tovrstne študije bolj primeren odsek I3-M11, ki je 23 aminokislin stran od 5'COI dela.

Počasna evolucija mtDNA (Shearer in sod., 2002; Hellberg, 2006) in majhna medvrstna raznolikost v mitohondrijskem zaporedju COI (Shearer in Coffroth, 2008; Martínez in sod., 2010) je verjetno značilna samo za koralnjake. Pri klobučnjaških meduzah (Holland in sod., 2004; Dawson 2005 a, b; Dawson in sod., 2005), trdoživnjakih (Govindarajan in sod., 2005 in 2006; Hemmrich in sod., 2007) in kubomeduzah so ugotovili večjo genetsko raznolikost markerja COI (Ortman in sod., 2010), ki je primerljiva z ostalimi višjimi metazoji (Huang in sod., 2008).

2.3.2 Jedrni markerji

V jedrnem genomu je teoretično ogromno število nukleotidnih zaporedij, ki bi jih lahko uporabili za filogenetske in filogeografske raziskave. Vendar nam številne tehnične in biološke omejitve ne dopuščajo, da bi vsa potencialna nukleotidna zaporedja tudi bila učinkoviti jedrni markerji (Dunn in sod., 2008). Pri klobučnjakih je od jedrnega genoma poznano le nukleotidno zaporedje rDNA operona iz uhatega klobučnjaka (Ki in sod., 2009). Velikost rDNA operona je 7731 bp, sestava in organizacija genov je enaka kot pri ostalih metazojih (Slika 7).



Slika 7: Geni za ribosomalne RNA uhatega klobučnjaka (Ki in sod., 2009).

Figure 7: Genes for ribosomal RNA of moon jelly (Ki et al., 2009).

Za številne jedrne lokuse je značilna razmeroma počasna evolucija. Jedrna DNA ima namreč več in bolj učinkovite mehanizme popravljanja DNA kot mtDNA. V jedru je DNA izpostavljena tudi bistveno manjšemu oksidativnemu stresu in je obdana z beljakovinami histoni. Večina lokusov je v genomu prisotna le v eni kopiji, zato je njihova izolacija relativno težavna. Dedovanje jedrne DNA je spolno vezano, tako na genetsko variabilnost jedrnega genoma poleg točkastih mutacij vpliva tudi rekombinacija alelov (Avisé, 2009).

Med nukleotidnimi zaporedji jedrnega genoma se za filogenetske analize najpogosteje uporabljajo zaporedja v delu, kjer so kodirani geni rRNA. Geni za ribosomalne RNA (18S, 5.8S in 28S) so v jedrnem genomu evkariontov zapisani v več sto kopijah, zato je njihova izolacija lažja in precej učinkovita. IGS, ITS1 in ITS2 so medgenski odseki v strukturnih rRNA genih. Organizirani so v točno določenem zaporedju t.i. rDNA operonu: IGS - 18S - ITS1 - 5.8S - ITS2 - 28S. Celoten operon se prepisuje kot ena prepisovalna enota. Dolge tandemske ponovitve rDNA operonov so običajno prisotne na več mestih v genomu (Lafontaine in Tollervey, 2001). Nekodirajoče regije IGS, ITS1 in ITS2 niso izpostavljene tako močnim selekcijskim pritiskom kot kodirajoče regije, zato so običajno bolj variabilne in informativne.

Veliko raznolikost v regijah ITS1 in ITS2 so ugotovili pri koralnjakih (Chen in sod., 1996; Forsman in sod., 2005) pri klobučnjakih (Schroth in sod., 2002; Dawson 2005 a; Dawson in sod., 2005) in trdoživnjakih (Meroz-Fine in sod., 2003; Martínez in sod., 2010). Raznolikost zaporedij ITS je primerljiva z ostalimi višjimi metazoji.

Pri regijah ITS se ob proučevanju njihove variabilnosti soočimo z dvema povsem nasprotujočima vzorcema genetske raznolikosti. Na ravni populacij se v regijah ITS substitucije lahko hitro fiksirajo, zato med številnimi populacijami zasledimo veliko variabilnost. Znotraj populacij pa hkrati lahko v več-genskih družinah, med katere se uvrščajo tudi geni za rRNA, prihaja do usklajene evolucije (angl. concerted evolution; Dover, 1982). Tako v primeru neenakega prekrižanja in genske konverzije prihaja do hitre homogenizacije nukleotidnih zaporedij znotraj populacije (Polanco in sod., 1998; Liao, 1999). Na stopnjo homogenizacije regij ITS dodatno lahko zelo vpliva še položaj ponavljajočih ribosomalnih operonov v genomu, saj so intrakromosomalne rekombinacije pogostejše od rekombinacij med kromosomi (Schlötterer in Tautz, 1994).

2.4 MOLEKULARNA FILOGENETIKA

Molekularna filogenetika rekonstruira sorodstvene odnose med skupinami živih ali izumrlih organizmov večinoma na podlagi informacij iz genomov. Tovrstne študije postajajo vedno bolj pomembne, saj lahko pojasnijo marsikatero nejasnost, s katerimi se soočamo pri klasičnih metodah določanja sorodnosti (paleontologija, morfološke študije). Predvsem pa omogočajo razjasnjevanje sorodstva med populacijami ali vrstami, ki na fenotipski ravni ne izražajo razlik (kriptične vrste). Sorodstvene povezave prikažemo s filogenetskim drevesom (povzeto po Avise, 2001).

2.4.1 Metode za izdelavo filogenetskih dreves

Podatke, ki jih pridobimo iz nukleotidnih zaporedij, analiziramo z metodami molekularne filogenetike, ki vključujejo metode za izračunavanje genetskih razdalj, metode za izdelavo filogenetskih dreves ter metode za analizo mrež. V vsakem primeru vzamemo za temeljno razliko med taksoni število nukleotidnih ali aminokislinskih substitucij. Analitične metode za izdelavo dreves lahko uvrstimo v dve skupini: distančne metode (angl. distance matrix methods) in metode z znaki (angl. character based methods). Pri distančnih metodah najprej izračunamo evolucijske razdalje med vsemi pari taksonov in nato rekonstruiramo filogenetsko drevo na podlagi algoritmov, ki temeljijo na funkcijskih odnosih med izračunanimi razdaljami. Pri metodah z znaki na podlagi predhodno izvedene ocene rekonstruiramo filogenetsko drevo tako, da iščemo najkrajšo ali najbolj verjetno pot, ki vodi do opaženih genetskih sprememb. Najbolj znane metode z znaki so: metoda varčnosti (angl. Maximum Parsimony – MP), metoda največjega verjetja (angl. Maximum Likelihood – ML) in Bayesov pristop. Analitične metode za izdelavo filogenetskih dreves lahko dopolnimo z metodami ponovnega vzorčenja. To so metode, ki izvedejo naključna vzorčenja, nato na osnovi analiz izdelajo konsenzusno drevo (angl. consensus tree) in ga statistično ovrednotijo. Najbolj znani metodi ponovnega vzorčenja sta: "bootstrap" in "Jackknife" (povzeto po Hall, 2008, Whelan in sod., 2001).

2.4.2 Filogenetska drevesa

Evolucijske odnose predstavljamo s filogenetskimi drevesi. Filogenetsko drevo je sestavljeno iz točk (razcepišča) in daljic (veje). Zunanje točke drevesa predstavljajo taksone ali tako imenovane obravnavane taksonomske enote (OTE; angl. operational taxonomic units – OTU). Vzorec razporeditve OTE imenujemo topologija drevesa. Določanje topologije drevesa je najbolj zahteven proces pri nastajanju filogenetskega drevesa in ga zato ugotavljamo z več statističnimi metodami. Filogenetska drevesa so lahko brez korenine ali koreninjena. Korenina drevesa je razcepišče, ki je skupno vsem OTE, ob tem pa je lahko med OTE in korenino še poljubno število notranjih razcepišč. Pri drevesih brez korenine vidimo samo sorodstvene odnose med OTE, nimamo pa vpogleda v evolucijska razmerja. Drevesa lahko ukoreninimo po različnih metodah, najbolj običajna je obravnava drevesa skupaj z neko zunanjo referenčno skupino (angl. outgroup). Primerna zunanja skupina je takson, ki ni evolucijsko preveč oddaljen od OTE in hkrati ni soroden nobeni OTE bolj, kot so si sorodne OTE med sabo. V primerih, ko upravičeno domnevamo, da je hitrost evolucije pri vseh OTE približno enaka, lahko brez zunanje skupine določimo lego korenine drevesa kar na polovici najdaljše poti med dvema OTE. Drevo, ki smo ga umerili z zunanjo skupino, imenujemo

umerjeno drevo ali filogram. Na umerjenem drevesu so dolžine vej sorazmerne številu sprememb. Drevo brez umerjenih dolžin vej je neumerjeno drevo ali kladogram (povzeto po Hall, 2008; Whelan in sod., 2001). Pri vsaki filogenetski raziskavi je priporočljivo preverjanje več lokusov, predvsem zaradi statističnega ovrednotenja možnih nihanj v pogostosti naključno ponavljajočih se nukleotidnih zamenjav pri enakih lokusih. Pri konstrukciji filogenetskega drevesa nikoli ne moremo biti povsem prepričani, katera filogenija je prava. Zato verodostojnost rekonstrukcij podpremo predvsem z analizami več daljših lokusov in z uporabo več različnih metod hkrati. Če pridemo do enake rešitve po več poteh, je rekonstrukcija sorodnosti zanesljiva (povzeto po Hall, 2008).

2.5 FILOGEOGRAFIJA

Filogeografija je raziskovalna smer, ki proučuje prostorsko razvrščanje haplotipov znotraj vrst ali med sorodnimi vrstami. Avise in sodelavci (1987) so bili začetniki tega področja. Filogeografija je hitro postala vodilno orodje za raziskovanje prostorskih in časovnih razsežnosti mikroevolucije. Predstavlja podlago za pojasnjevanje vzrokov in procesov, ki določajo geografsko razširjenost genetskih linij, za oceno vpliva recentnega genskega pretoka in preteklih demografskih procesov v populacijah. V bistvu je filogeografija vezni člen med dvema poprej povsem ločenima disciplinama populacijsko genetiko in filogenetsko biologijo (Avise, 2009).

Na mitohondrijskih in/ali jedrnih zaporedjih DNA temelji večina filogeografskih raziskav, ki ugotavljajo stopnjo genskega pretoka med populacijami oz. filogenetsko in geografsko členjenost znotraj vrst. Običajno je filogenetsko drevo osnova za filogeografsko analizo, v kateri nadalje statistično dobro podprte filogenetske skupine povežemo s podatki o razširjenosti organizmov. Po fragmentaciji populacij ni nujno, da so vedno vse skupine monofiletske (skupine organizmov, ki vključujejo najbližje skupne prednike in vse njihove potomce). Če je do fragmentacije populacij prišlo nedavno, so lahko v ločenih genskih skladih še vedno prisotni enaki haplotipi in so zato določene novonastale filogeografske skupine parafiletske (Avise, 2000).

Naraščanje števila filogeografskih raziskav v zadnjih dveh desetletjih je omogočilo razvoj primerjalne filogeografije. To je nadgradnja filogeografskih raziskav, ki primerja geografske vzorce genetske raznolikosti (filogeografske vzorce) med taksoni s podobno razširjenostjo. Primerjalna filogeografija tako nudi vpogled v biogeografsko zgodovino območja in razumevanje vloge geoloških, klimatskih in ekoloških dejavnikov na oblikovanje znotrajvrstne variabilnosti in geografske razširjenosti taksonov (Wares in Cunningham, 2001; Avise, 2009). Če različni taksoni s podobno razširjenostjo kažejo skladne filogeografske vzorce, to potrjuje hipotezo, da je zaporedje preteklih dogodkov podobno vplivalo na oblikovanje njihove filogeografske razporeditve (Avise, 1992; Bowen in Grant, 1997; Dawson 2001). Neskladje med filogeografskimi vzorci taksonov z istega območja pa kaže na neodvisen odziv posameznih vrst oz. organizmov na skupne evolucijske procese zaradi razlik v ekologiji in biologiji posamezne vrste ali različnih demografskih procesov znotraj vrst (Bremer in sod., 2005; Patarnello in sod., 2007; Pelc in sod., 2009).

2.5.1 Dejavniki , ki vplivajo na filogeografske vzorce

Potek evolucije je odvisen od dejavnikov naravne selekcije, mutacij, genetskega drifta, genskega pretoka in nenaključnega parjenja. Vikarianca in disperzija pa sta procesa, ki vplivata na geografsko strukturiranost genetskih linij. Vikarianca je proces fragmentacije vrste zaradi ekološke ali geografske pregrade, kar onemogoča genski pretok in vodi v izolacijo genetskega sklada. Disperzija je proces širjenja vrste na nova območja, kar vodi do diferenciacije zaradi izolacije z razdaljo, naključnega genetskega drifta in razvrščanja linij (angl. lineage sorting). Oba procesa vodita v nastanek ločenih populacij z različnimi genetskimi skladi, ki se nadalje lahko razvijejo v samostojne vrste ali pa ponovno vzpostavijo stik (sekundarni stik). Evolucija vrste običajno ne poteka samo z vikarianco ali samo z disperzijo, temveč se v evolucijskih procesih pogosto oba procesa prepletata (Avice, 2000).

Stopnja genskega pretoka med populacijami opredeljuje delež osebkov iz ene populacije, ki se pariyo v drugi populaciji in s tem prenesejo svoje gene v drugo populacijo. Če je stopnja genskega pretoka visoka, so take populacije v resnici ena sama, panmiktična populacija. Genski pretok med populacijami lahko poteka na več načinov: (i) enosmeren pretok iz velike populacije v majhne izolirane populacije, (ii) naključen pretok med sosednjimi populacijami, (iii) postopni pretok znotraj večje populacije, v kateri se frekvence alelov spreminjajo zvezno vzdolž areala populacije (Avice, 2000).

V morskem okolju je običajno manj geografskih ovir kot na kopnem. Tako se navidezno zdi, da v morskih ekosistemih skoraj ni ovir za genski pretok in je panmiksija zelo verjeten scenarij pri vrstah z veliko sposobnostjo razširjanja (Cowen in sod., 2000). Če ovir za genski pretok ni, pa med genskimi skladi populacij skoraj ni razlik. Vendar številne filogeografske študije pri morskih organizmih kažejo različne vzorce geografske strukturiranosti. Patarnello in sodelavci (2007) so na podlagi 20 filogeografskih študij ocenjevali vlogo Gibraltarske ožine na genski pretok. Odkrili so celo paleto možnosti od popolne do delne in nikakršne genetske izoliranosti. Kljub nasprotujočim dejstvom raziskovalci priznavajo, da fizikalno-oceanografski dejavniki in življenjske strategije vplivajo na genetsko strukturo morskih vrst, vendar relativna vloga teh dejavnikov ostaja nepojasnjena (Neethling in sod., 2008). Dolgo časa je veljalo, da imajo vrste z veliko zmožnostjo širjenja majhno ali nikakršno genetsko strukturiranost na velikih območjih oceanov in obalnih morij. Vrste s kratkoživečimi planktonskimi larvalnimi stadiji pa imajo večjo genetsko strukturiranost (Palumbi, 1994). Patarnello in sodelavci (2007) so po natančni primerjavi več morskih vrst z različnimi življenjskimi strategijami dobili precej nasprotujoče si rezultate, ko so primerjali populacije v Sredozemskem morju in Atlantiku, kjer očitno oviro predstavlja Gibraltarska ožina. Izrazite korelacije med življenjskimi strategijami in strukturo populacij namreč niso odkrili. Tako postaja vse bolj očitno, da so znotrajvrstni filogeografski vzorci zelo vrstno specifični in jih ne moremo posploševati niti na sorodne taksone, pa čeprav imajo enake življenjske strategije in sposobnosti širjenja (Burton, 1998).

Pri klobučnjaških meduzah pa moramo biti pozorni še na en dejavnik, ki lahko potencialno tudi vpliva na filogeografski vzorec. To je sposobnost periodičnih množičnih pojavljanj klobučnjakov. Vpliv obdobj množičnih pojavljanj na genski pretok še ni razjasnjen. Prav tako tudi ni jasnega odgovora, kako periodična nihanja v velikosti populacij vplivajo na genetsko raznolikost in efektivno velikost populacij (N_e). Klobučnjaki v svoji evoluciji namreč izmenično menjujejo oba procesa – doseganje velikih populacij v obdobjih množičnega pojavljanja in velike populacijske redukcije v obdobjih po množičnem pojavu.

Za vrste, ki imajo velike populacije, se po nevtralni teoriji evolucije pričakuje, da imajo veliko genetsko raznolikost (Kimura, 1983). Nasprotno se pričakuje, da se genetska raznolikost zmanjša v primeru zelo velikih redukcij populacijske velikosti (Nei in sod., 1975).

2.5.2 Filogeografske raziskave klobučnjaških meduz

Filogeografskih raziskav pri klobučnjakih je razmeroma malo. Verjetno je to dejstvo posledica nepredvidljivega pojavljanja klobučnjaških meduz in nepoznavanja nahajališč polipov v naravnem okolju. Tako je zelo težko pridobiti vzorce iz več različnih območij, kar je bistveno za verodostojno filogeografsko raziskavo. Med vsemi klobučnjaki je še najbolj raziskan uhati klobučnjak (Dawson in Jacobs, 2001; Schroth in sod., 2002; Dawson in sod., 2005; Matsumura in sod., 2005; Ki in sod., 2008). V Preglednici 1 je pregled filogeografskih raziskav, ki so bile do sedaj narejene na klobučnjaških meduzah.

Preglednica 1: Pregled filogeografskih raziskav klobučnjaških meduz.

Table 1: Review of phylogenetic analysis in scyphozoans.

Značilnosti življenjskega cikla	Vrsta	Genetski marker	Geografska območja vključena v raziskavo	Geografska strukturiranost	Reference
meroplanktonski	<i>Aurelia aurita</i>	COI, ITS1	Tihi ocean, Atlantski ocean, Sredozemsko morje, Severno morje, Črno morje	da	Dawson in Jacobs 2001 Dawson in Martin 2001
	<i>Aurelia aurita</i>	16S, ITS1	Atlantski ocean, Tihi ocean, Indijski ocean, Sredozemsko morje, Črno morje, Rdeče morje, Baltsko morje, Severno morje	da	Schroth in sod. 2002
	<i>Aurelia aurita</i>	COI, ITS1, ITS2	Atlantski ocean, Tihi ocean, Sredozemsko morje, Črno morje, Rdeče morje, Severno morje	da	Dawson in sod. 2005 Ki in sod. 2008
	<i>Aurelia aurita</i>	COI, ITS1	obalno morje Japonske	da	Matsumura in sod. 2005
	<i>Mastigias paupa</i>	COI, ITS1	jezera na otočju Palau, Papua Nova Gvineja	da	Dawson in Hamner 2005 Dawson 2005 b,c
	<i>Cyanea capillata</i>	COI, ITS1	Jugovzhodni Tihi ocean, Severovzhodni Tihi ocean, Severno morje	da	Dawson 2005a
	<i>Catostylus mosaicus</i>	COI, ITS1	Jugovzhodni Tihi ocean	da	Dawson 2005 d, e
	<i>Cassiopea andromeda</i>	COI	Tihi ocean, Rdeče morje	da	Holland in sod. 2004
	<i>Cassiopea frondosa</i>	COI	Zahodni Atlantik	da	Holland in sod. 2004
holoplanktonski	<i>Pelagia noctiluca</i>	COI, ITS1, ITS2	Severni Atlantik, Sredozemsko morje	ne	Stopar in sod. 2010

2.5.2.1 Filogeografske raziskave uhatega klobučnjaka

Uhati klobučnjak (*Aurelia aurita*) je med klobučnjaki najboljše proučena vrsta. Do prvih filogeografskih raziskav (Dawson in Jacobs, 2001; Dawson in Martin, 2001) je uhati klobučnjak veljal za ekološko zelo prilagodljivo kozmopolitsko vrsto z velikim arealom pojavljanja. V zadnjem desetletju so znotraj vrste *A. aurita* na podlagi markerjev COI in ITS1 ugotovili več genetsko zelo raznolikih linij. Nove linije uhatih klobučnjakov sta Dawson in Jacobs (2001) določila in poimenovala kar kot nove kriptične vrste *Aurelia* sp. 1 – *Aurelia* sp. 6 ter jih uvrstila poleg prej poznanih vrst *A. aurita*, *A. limbata* in *A. labiata*. Med novimi kriptičnimi vrstami so bile razlike v nukleotidnem zaporedju ITS1 od 10 % do 40 %, v zaporedju COI pa od 13 % do 24 %. Nadaljnje raziskave z markerjema 16S rDNA in ITS1/5.8S rDNA, ki so jih naredili Schroth in sodelavci (2002), so tudi potrdile veliko genetsko raznolikost v rodu *Aurelia*. Določili so osem linij: *A. limbata*, *A. labiata*, *A. aurita* (UBI), *A. borealis* (BOR), *Aurelia* TET (Rdeče morje), *Aurelia* MKL (Mljet), *Aurelia* ARAB (Rdeče morje), *Aurelia* MCA (neznan tropski izvor). Razlike v nukleotidnem zaporedju so bile ugotovljene od 7.8 % do 14 % v COI in od 5 % do 32 % v ITS1/5.8S. Najobsežnejša filogeografska raziskava z markerjema COI in ITS1-5.8S-ITS2 (Dawson in sod., 2005) je vsebovala osebkke iz območij Atlantskega oceana, Tihega oceana, Indijskega oceana. Sredozemskega morja, Črnega morja, Rdečega morja, Baltskega morja in Severnega morja. Na osnovi te raziskave so poimenovali še štiri nove linije oz. kriptične vrste (*Aurelia* sp. 7 – *Aurelia* sp. 10). Rezultati raziskav na meduzah uhatih klobučnjakov iz obalnega morja ob Koreji in Japonski so pokazali največjo podobnost z *Aurelia* sp. 1 (Matsumura in sod., 2005; Ki in sod., 2008).

Glede na rezultate filogeografskih raziskav Dawsona in sodelavcev (2005) rod *Aurelia* sestavlja najmanj 13 kriptičnih vrst:

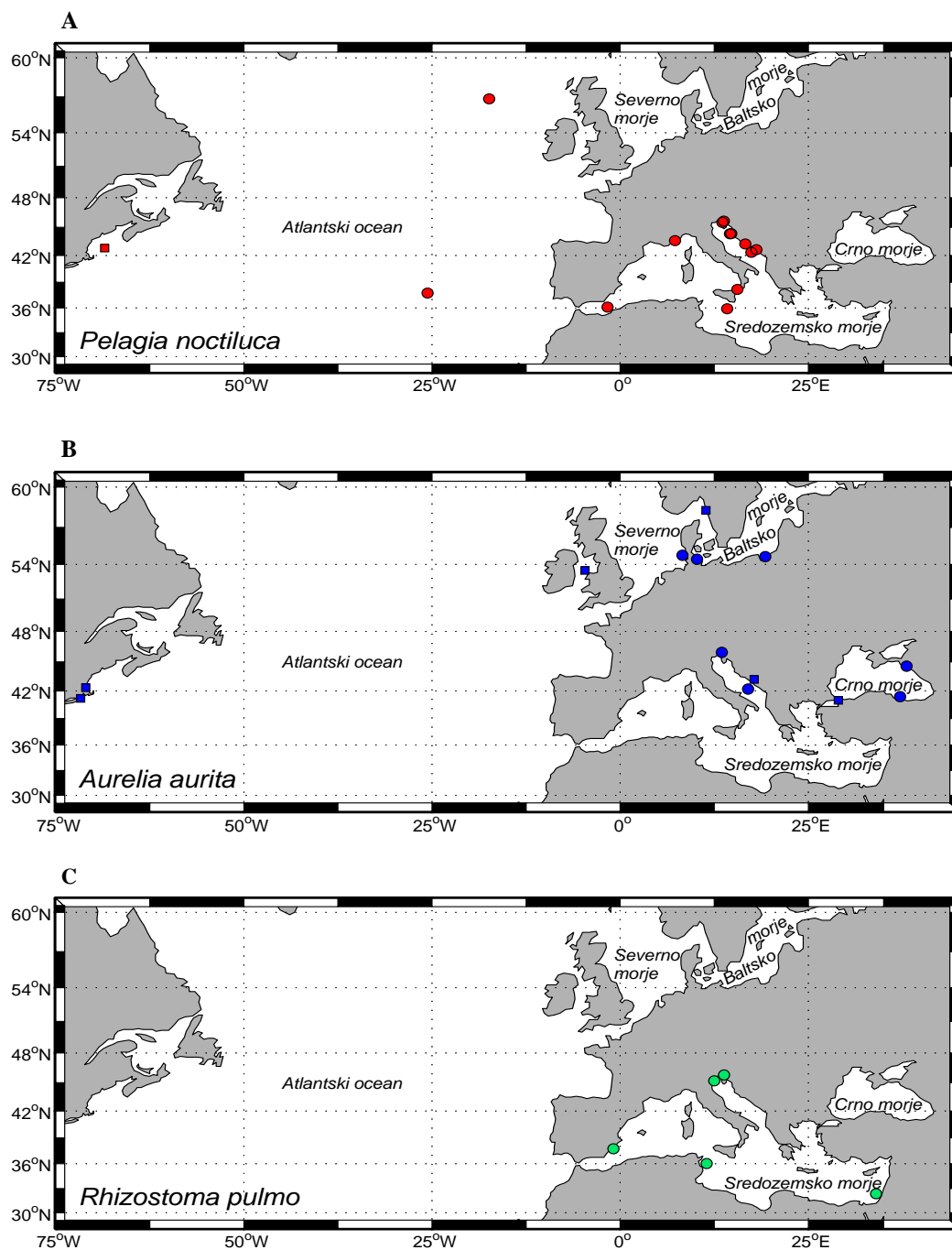
- *A. aurita* - (linija *A. borealis* - BOR po Schrothu in sod., 2002) - Severni Atlantik, Baltsko in Severno morje, Črno morje,
- *A. limbata* - severozahodni Tihi Ocean,
- *A. labiata* - severovzhodni Tihi Ocean,
- *Aurelia* sp. 1 - (linija *A. aurita* - UBI po Schrothu in sod., 2002) Tihi ocean, zahodna obala Atlantskega oceana (Francija), severozahodna obala Sredozemskega morja (Francija),
- *Aurelia* sp. 2 - Brazilija,
- *Aurelia* sp. 3 - jezera na otočju Palau,
- *Aurelia* sp. 4 - jezera na otočju Palau, Borneo, Hawaii,
- *Aurelia* sp. 5 - (linija *Aurelia* sp. - MKL po Schrothu in sod., 2002) jezera na otoku Mljet,
- *Aurelia* sp. 6 - jezera na otočju Palau, Papua Nova Gvineja,
- *Aurelia* sp. 7 - južni Tihi Ocean,
- *Aurelia* sp. 8 - (linija *Aurelia* sp. - TET po Schrothu in sod., 2002) - Sredozemsko in Rdeče morje,
- *Aurelia* sp. 9 - Mehiški zaliv, zahodni Atlantski ocean,
- *Aurelia* sp. 10 - severni Tihi ocean.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORČEVANJE

V raziskavo smo vključili vzorce klobučnjaških meduz (mesečinke, uhati in veliki klobučnjaki) iz različnih geografskih območij evropskih morij: Atlantskega oceana, Severnega, Baltskega, Sredozemskega in Črnega morja (Slika 8). Večina vzorcev je bila nabranih v obdobju množičnega pojavljanja meduz. Natančen popis vzorcev, datumov vzorčevanja in vzorčevanih mest je v Prilogi A.

Za analize smo izolirali genomsko DNA iz koščka gonad ali roba klobuka v velikosti približno $0,5 \text{ cm}^3$. Vzorce smo do izolacije DNA hranili zamrznjene na -80°C v raztopini DMSO/NaCl (Seutin in sod., 1991) ali 96 % etanolu ali 99 % acetonu.



Slika 8: Zemljevid Sredozemskega morja in severnega Atlantskega oceana z označenimi mesti vzorčevanja za mesečinke (A), uhate klobučnjake (B) in velike klobučnjake (C): krogi - lokacije, s katerih smo pridobili osebke in nukleotidna zaporedja regij COI in ITS, kvadrati - lokacije, na katerih so vzorčevali tudi drugi raziskovalci in so nukleotidna zaporedja COI in ITS že objavljena v javni podatkovni zbirki GenBank.

Figure 8: Map of the Mediterranean Sea and North Atlantic Ocean showing sampled locations for mauve stinger (A), moon jelly (B) and barrel jellyfish (C): circles - sampling locations of samples from which sequences of COI and ITS regions were acquired during this study, squares - sampling locations of other researchers, whose sequences of COI and ITS regions are published in GenBank database.

3.2 METODE DELA

Pri delu smo se držali načel dobre laboratorijske prakse, ki so uveljavljena v postopkih molekularne biologije: uporabljali smo zaščitna sredstva, sterilen pribor, steklovino in plastiko. Delovne raztopine kemikalij smo sterilizirali z avtoklaviranjem (121°C, 20 min; avtoklav Kambič, Slovenija) ali s filtriranjem (premer por v filtru 0,22 µm). Prostorsko smo ločili izolacijo DNA in njeno pomnoževanje s PCR. PCR mešanice smo pripravljali v aseptični komori (M15, Iskra PIO, Slovenija), ki smo jo pred in po uporabi očistili z 70 % etanolom in sterilizirali z UV obsevanjem.

3.2.1 Izolacija genomske DNA

Za izolacijo genomske DNA smo večinoma uporabljali dva protokola: protokol CTAB (Winnepeninckx in sod., 1993) ali komercialni DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Nemčija). Protokol CTAB temelji na uporabi kationskega detergenta v raztopini z visoko ionsko močjo (> 0,7 M NaCl). V teh pogojih tvori cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) komplekse z beljakovinami in z večino kislih polisaharidov, medtem ko nukleinskih kislin ne obori (Sambrook in Russell, 2001). V DNeasy Blood and Tissue Kitu se DNA v prisotnosti pufru z visokimi koncentracijami kaotropnih soli veže na silikatno membrano. Na membrano vezano DNA očistimo s pufri z dodanim etanolom in speremo DNA z membrane z vodo ali Tris-EDTA (TE) pufrom.

Učinkovitost izolacije DNA smo testirali še z dvema protokoloma: Chelex 100 (Walsh in sod., 1991) in Wizard Magnetic DNA Purification System for Food (Promega, ZDA). Protokol Chelex 100 temelji na vezavi ionov in polarnih celičnih komponent na polarni polimer divinilbenzen stiren, nepolarna DNA ostane v raztopini. Wizard Magnetic DNA Purification System for Food temelji na vezavi DNA na magnetne delce v pufrih z visoko ionsko jakostjo. Na magnetne delce vezano DNA očistimo s pufri, ki vsebujejo etanol. V zadnjem koraku z vodo ali pufrom TE speremo vezano DNA z magnetnih delcev.

Za pripravo vseh potrebnih raztopin smo uporabljali miliQ vodo (Millipore, Billerica, ZDA). Vse kemikalije potrebne za pripravo raztopin so bile od proizvajalca SIGMA (St. Luis, ZDA), razen etanola (MERCK, Darmstadt, Nemčija) in CTAB (Calbiochem, CA, ZDA). Vzorce smo tehtali na tehtnici BP211D (Sartorius, Nemčija) in sušili v inkubatorju (Kambič, Slovenija). Vse raztopine smo premešali na mešalu MS1 (Minishaker - IKA, Nemčija) in centrifugirali v hlajeni centrifugi 5417R (Eppendorf, Nemčija) ali namizni centrifugi 5415D (Eppendorf, Nemčija). Inkubacije so potekale v vodni kopeli WB-45ST (Kambič, Slovenija) ali termo bloku BioTDB-120 (Biosan, Latvija).

3.2.1.1 Protokol CTAB

- (a) Manjšo količino (približno 0,5 cm³ oz. 25 mg) konzerviranega meduznega tkiva (rob klobuka ali gonade) smo dali v 1,5 ml-mikrocentrifugirko. Če je bilo tkivo konzervirano v 96 % etanolu, smo najprej v sušilniku pri 60°C odparili etanol iz tkiva.

- (b) Tkivu smo dodali 600 µl 2x CTAB [2-odstoten (w/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2-odstoten (v/v) β-merkaptoetanol] in 3 µl proteinaze K (založne raztopine v koncentraciji 20 mg/ml).
- (c) Vzorce smo premešali na mešalu in jih inkubirali v vodni kopeli ali termo bloku na 55°C preko noči.
- (d) Po inkubaciji smo vzorcem dodali 600 µl mešanice kloroforma in izoamilalkohola pripravljene v razmerju 24 : 1 in jih dobro premešali.
- (e) Nastalo suspenzijo smo centrifugirali 10 minut pri centrifugalni sili 14000 g na temperaturi 10°C.
- (f) Supernatant smo previdno prenesli v novo 1,5 ml-mikrocentrifugirko, dodali 600 µl mešanice kloroforma in izoamilalkohola pripravljeno v razmerju 24 : 1 in dobro premešali.
- (g) Nastalo suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri centrifugalni sili 14000 g na temperaturi 4°C.
- (h) Supernatant smo previdno prenesli v novo 1,5 ml-mikrocentrifugirko in DNA oborili z dodatkom 1/10 volumna 3 M natrijevega acetata (pH 5,2, uravnan z očetno kislino) in enim volumnom ledenohladnega izopropanola (hranjen pri -20°C). Vzorce smo premešali in inkubirali eno uro na -20°C.
- (i) Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 20 minut pri 14000 g in 4°C. Supernatant smo zavrgli in spirali DNA v 500 µl hladnega 70 % etanola (hranjen pri -20°C).
- (j) Vzorce smo centrifugirali 2 minuti pri 14000 g in 4°C. Etanol smo previdno odlili in posušili vzorce na sobni temperaturi.
- (k) DNA smo raztopili v 50µl TE raztopine [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] in vzorce shranili na -20°C ali -80°C.

3.2.1.2 Protokol za DNeasy Blood and Tissue Kit

Komercialni komplet DNeasy Blood and Tissue Kit je namenjen izolaciji DNA iz različnih tkiv. Za izolacijo DNA iz meduz smo uporabili protokol, ki je namenjen izolaciji DNA iz živalskih tkiv in je opisan v navodilih proizvajalca (Purification of Total DNA from Animal Tissues, Qiagen, Nemčija). Imena uporabljenih reagentov so komercialna in obrazložena v navodilih proizvajalca.

- (a) Manjšo količino (približno 0,5 cm³ oz. 25 mg) konzerviranega meduznega tkiva (rob klobuka ali gonade) smo razrezali na čim manjše koščke in ga dali v 1,5 ml-mikrocentrifugirko. Če je bilo tkivo konzervirano v 96 % etanolu, smo najprej v inkubatorju odparili etanol iz tkiva.
- (b) Tkivu smo dodali 180 µl pufra ATL (vsebuje SDS in EDTA) in 20 µl proteinaze K.
- (c) Vzorce smo premešali na mešalu in jih inkubirali v vodni kopeli ali termo bloku na 56°C 3 ure ali preko noči.
- (d) Po inkubaciji smo dodali 4 µl RNaze A [založna raztopina v koncentraciji 100 mg/ml], dobro premešali na mešalu in inkubirali 2 minuti na sobni temperaturi (ta korak ni bil obvezen, lahko smo ga tudi izpustili).
- (e) Dodali smo 200 µl pufra AL, dobro premešali 1,5 ml-mikrocentrifugirko in dodali še 200 µl 96 % etanola ter ponovno dobro premešali mikrocentrifugirko

- (f) Mešanico smo nanесли na DNeasy Mini spin kolono in centrifugirali 1 minuto pri 6800 g na sobni temperaturi (vsa nadaljnja centrifugiranja isto pri sobni temperaturi).
- (g) Na kolono smo nanесли 500 μ l pufra AW1 in jo sprali z 1 minutnim centrifugiranjem pri 6800 g.
- (h) Pri drugem spiranju smo na kolono nanесли 500 μ l pufra AW2 in centrifugirali 1 minuto pri 20000 g.
- (i) Na kolono smo nanесли 100 μ l pufra AE, počakali 1 minuto, nato smo zbrali vzorec z 1 minutnim centrifugiranjem pri 6800 g v 1,5 ml-mikrocentrifugirko.
- (j) Vzorce izolirane genomske DNA smo hranili na -20°C ali -80°C .

3.2.1.3 Protokol z magnetnimi delci

Komercialni komplet Wizard Magnetic DNA Purification System for Food (Promega, ZDA) je namenjen izolaciji DNA iz različnih vrst hrane. Izolacijo DNA iz tkiva meduz smo delali po protokolu, ki je priložen v navodilih proizvajalca in je namenjen izolaciji DNA iz tkivnih vzorcev, ki tehtajo do 200 mg. Uporabljali smo v kompletu priložene magnetne delce in reagente.

- (a) Manjšo količino (0,5 cm^3 oz. 25 mg) konzerviranega meduznega tkiva (rob klobuka ali gonade) smo razrezali na čim manjše koščke in ga dali v 2 ml-mikrocentrifugirko. Če je bilo tkivo konzervirano v 96 % etanolu, smo najprej v inkubatorju na 60°C odparili etanol iz tkiva.
- (b) Tkivu smo dodali 500 μ l pufra A za lizo celic in 5 μ l RNaze A.
- (c) Vzorce smo dobro premešali na mešalu.
- (d) Dodali smo 250 μ l pufra B za lizo celic.
- (e) Vzorce smo dobro premešali na mešalu in jih inkubirali 10 minut na sobni temperaturi.
- (f) Po inkubaciji smo dodali 750 μ l raztopine za obarjanje, dobro premešali 2 ml-mikrocentrifugirko na mešalu.
- (g) 2 ml-mikrocentrifugirke smo centrifugirali na sobni temperaturi 10 minut pri centrifugalni sili 13000 g.
- (h) Supernatant smo s pipeto prenesli v novo 2 ml-mikrocentrifugirko.
- (i) Na mešalu smo močno mešali steklenico s suspenzijo delcev MagneSil Paramagnetic, dokler niso bili delci dobro resuspendirani. Takoj smo iz steklenice odvzeli 50 μ l suspenzije magnetnih delcev in jih dodali supernatatu. Mešanico supernatanta in magnetnih delcev smo dobro premešali na mešalu.
- (j) Mešanici smo dodali 4/5 volumna izopropanola in jo dobro premešali.
- (k) 5 minut smo mešanico inkubirali na sobni temperaturi in jo vmes večkrat premešali.
- (l) 2 ml-mikrocentrifugirko smo postavili v magnetno stojalo (Promega, ZDA) in pustili pri miru 1 minuto, da so se magnetni delci zbrali ob magnetu.
- (m) Tekočo fazo smo odpipetirali od magnetnih delcev.
- (n) 2 ml-mikrocentrifugirko z magnetnimi delci smo vzeli iz magnetnega stojala in dodali 250 μ l pufra B za lizo celic ter dobro premešali, da so se magnetni delci ponovno popolnoma resuspendirali v suspenziji.
- (o) Ponovili smo postopek pod točkama (l) in (m).

- (p) 2 ml-mikrocentrifugirko z magnetnimi delci smo vzeli iz magnetnega stojala, dodali 1 ml 70 % etanola in dobro premešali, da so se magnetni delci ponovno popolnoma resuspendirali v suspenziji.
- (q) Postopek pod točkami (l), (m) in (p) smo še dvakrat ponovili.
- (r) V zadnji ponovitvi smo s pipeto čimbolj, kolikor je bilo mogoče, odstranili tekočo fazo in preostale magnetne delce posušili 10 minut v termo bloku na 65°C.
- (s) Magnetnim delcem smo dodali 100 µl pufra TE, dobro premešali na mešalu in inkubirali 5 minut v termo bloku na 65°C.
- (t) 2 ml-mikrocentrifugirko smo postavili v magnetno stojalo in pustili 1 minuto, da so se magnetni delci zbrali ob magnetu.
- (u) Puffer TE z raztopljeno genomsko DNA smo prenesli v novo 1,5 ml-mikrocentrifugirko in shranili na -20°C ali -80°C.

3.2.1.4 Protokol Chelex 100

Delali smo po rahlo modificiranem protokolu kot Walsh in sodelavci (1991). Uporabljali smo polimere velikosti 200 – 400 mesh Chelex 100 (Biotechnology Grade, Bio-Rad, ZDA). Pred izolacijo smo pripravili 5 % raztopino Chelex 100 [Chelex 100 v dH₂O].

- (a) Manjšo količino (0,5 cm³ oz. 25 mg) konzerviranega meduznega tkiva (rob klobuka ali gonade) smo razrezali na čim manjše koščke in ga dali v 1,5 ml-mikrocentrifugirko.
- (b) Tkivu smo dodali 200 µl 5 % raztopine Chelex 100.
- (c) Vzorce smo premešali na mešalu in jih inkubirali 20 minut v termo bloku na 99°C.
- (d) Po inkubaciji smo 1,5 ml-mikrocentrifugirke prenesli v ohlajeno centrifugo in 10 minut centrifugirali na 4°C pri 7000 g.
- (e) Raztopino z raztopljeno genomsko DNA smo prenesli v novo 1,5 ml-mikrocentrifugirko in shranili na -20°C ali -80°C.

3.2.1.5 Razgradnja RNA v vzorcih genske DNA

V vzorcih, kjer v postopku izolacije DNA nismo razgradili RNA, smo le to razgradili naknadno z dodatkom encima RNazaA.

- (a) V 50 µl izolirane genske DNA smo dodali 2 µl RNaze A (Qiagen, založna raztopina v koncentraciji 100 mg/ml), premešali na mešalu in inkubirali 2 minuti na sobni temperaturi.
- (b) DNA smo oborili z dodatkom 1/10 volumna 3 M natrijevega acetata (pH 5,2, uravnan z očetno kislino) in enim volumnom ledenohladnega izopropanola (hranjen pri -20°C). Vzorce smo premešali in inkubirali 1 uro na -20°C.
- (c) Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 20 minut na 4°C pri 14.000 g. Supernatant smo zavrgli in spirali DNA v 500 µl hladnega 70 % etanola (hranjen pri -20°C).
- (d) Vzorce smo centrifugirali 2 minuti pri 14.000 g in 4°C. Etanol smo previdno odlili in posušili vzorce na sobni temperaturi.

(e) DNA smo raztopili v 50 μ l TE pufru in vzorce shranili na -20°C ali -80°C .

3.2.2 Merjenje koncentracije DNA

Koncentracije DNA smo izmerili z mini fluorometrom Qubit (Invitrogen, ZDA). Za določanje koncentracije v vzorcih z genomsko DNA smo uporabili Quant-iT dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, ZDA). Koncentracije fragmentov PCR smo merili v Quant-iT dsDNA HS Assay Kitu (Invitrogen, ZDA). Za meritev smo uporabili 1 μ l genomske DNA ali vzorca PCR in 199 μ l delovne raztopine (pripravljene po navodilih proizvajalca z že dodanim fluorokromom). Za umeritev aparata smo uporabljali dva standarda, ki sta priložena kompletu reagentov.

3.2.3 Agarozna elektroforeza

Vzorce smo analizirali v horizontalni agarozni elektroforezi v $1 \times$ elektroforetskem pufru TAE [44,5 mM Tris (SIGMA, ZDA), 44,5 mM ledocetna kislina (MERCK, Nemčija) in 1 mM EDTA (SIGMA, ZDA)]. Agarozna (SIGMA, St. Luis, ZDA) je bila raztopljena v $1 \times$ TAE. Koncentracijo agaroze v gelu smo prilagodili glede na dolžino fragmentov in je navedena v nadaljevanju pri opisanih postopkih. Elektroforeza je potekala pri napetosti 7 V/cm. Uporabljali smo elektroforetske banjice modela Compact M in Agagel maxi (Biometra, Nemčija). Na gel smo v razmerju 1:1 nanесли mešanico vzorca DNA (PCR fragmenti ali genomsko DNA) in nanašalnega barvila [40-odstotna (w/v) saharoza, 0,25-odstoten (w/v) brom fenol modro]. Poleg vzorcev smo na gel nanесли tudi ustrezen velikostni standard.

Za PCR fragmente smo nanašali velikostni standard 100 bp DNA marker (Promega, ZDA). V jamico na gelu smo nanесли 200 ng markerja. Marker je na gelu razvil 11 fragmentov v velikosti: 1500 bp, 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp in 100 bp. Za genomsko DNA smo nanašali velikostni standard Lambda DNA/Hind III marker (Promega, ZDA). V jamico na gelu smo nanесли 200 ng markerja. Marker je na gelu razvil 8 fragmentov v velikosti: 23.130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp in 125 bp.

DNA smo obarvali z etidijevim bromidom (SIGMA, St. Luis, ZDA), ki smo ga predhodno dodali v agarozni gel v koncentraciji 0,2 $\mu\text{g/ml}$ [iz založne vodne raztopine s koncentracijo 10 mg/ml]. Gele smo pregledovali na transiluminatorju UVIsafe (UVItec, Velika Britanija) in jih fotografirali z digitalno kamero UVIsave GAS9202 (UVItec, Velika Britanija).

3.2.4 Pomnoževanje in določanje nukleotidnega zaporedja mitohondrijskih in jedrnih markerjev

Začetni oligonukleotidi za PCR so bili sintetizirani v podjetju Jena Bioscience (Jena, Nemčija). Za PCR smo uporabljali DNA polimeraze različnih vrst in proizvajalcev: *Taq* (Fermentas, Litva), *Go-Taq* in *Pfu* (Promega, ZDA), *Top Taq* (Qiagen, ZDA) in ustrezne priložene reagente (pufer PCR, MgCl_2 in dodatki). Mešanica dNTP-jev je bila proizvajalca

Promega (Madison, ZDA). Uporabljali smo dvakrat destilirano in sterilizirano vodo (SIGMA, St. Luis, ZDA).

3.2.4.1 Pomnoževanje mitohondrijskega markerja (regija COI)

Regijo COI smo v vrstah mesečinka in veliki klobučnjak pomnoževali s parom univerzalnih nevretenčarskih začetnih oligonukleotidov LCO1490 in HCO2198 (Folmer in sod., 1994), ki omogočata pomnoževanje dela gena COI. V 1580 bp dolgem zapisu za gen COI (Shao in sod., 2006), vodilni začetni oligonukleotid LCO1490 nalega na 57. nukleotidnem mestu, povratni začetni oligonukleotid pa nalega na 711. nukleotidnem mestu. V vzorcih uhatega klobučnjaka smo regijo COI pomnoževali z začetnima oligonukleotidoma AU-LCO in AU-HCO, ki smo ju sami oblikovali. To sta nekoliko spremenjena začetna oligonukleotida LCO1490 in HCO2198 (spremenjeni nukleotidi so obarvani sivo).

vodilni začetni oligonukleotid - **LCO1490** 5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3'
- **AU-LCO** 5'**TCTCAACTAACCACAAAGATATAGG3'**

povratni začetni oligonukleotid - **HCO2198** 5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA3'
- **AU-HCO** 5'TAC**ACTTCTGGGTGTCCAAAAAACCA3'**

Kot izhodišče smo za pomnoževanje regije COI pri vseh vzorcih meduz vzeli naslednje pogoje pomnoževanja:

- (a) Reakcijski volumen mešanice za PCR je bil 50 µl in je vseboval 50 – 100 ng genomske DNA, 1 x pufer PCR, 0,2 mM vsakega dNTP-ja, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 µM vsakega začetnega oligonukleotida in 1,25 enote *Taq* DNA polimeraze.
- (b) Vzorce smo pomnoževali po naslednjem protokolu: začetna 3-minutna denaturacija na 95°C, kateri je sledilo 35 ciklov: denaturacija na 95°C (1 minuta), prileganje na 40°C (1 minuta), podaljševanje na 72°C (90 sekund) in na koncu 7-minutna inkubacija na 72°C. Pomnoževanje smo izvajali v cikličnih termostatih PTC-200 DNA (MJ Research, ZDA) in GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, ZDA).
- (c) Vzorcem, ki jih ob izhodiščnih pogojih pomnoževanja nismo uspeli pomnožiti ali pa je bilo pomnožene DNA zelo malo, smo spreminjali pogoje pomnoževanja. Izhodiščnim pogojem pomnoževanja smo (posamezno ali v kombinaciji):
 - povečali ali zmanjšali koncentracijo začetnih oligonukleotidov,
 - povečali ali zmanjšali koncentracijo MgCl₂,
 - povečali ali zmanjšali koncentracijo genomske DNA,
 - zamenjali vrsto polimeraze (drugi proizvajalec ali kvalitetnejši tip polimeraze istega proizvajalca),
 - zamenjali pufer PCR s pufrom, ki je vseboval amonijev sulfat,
 - izvedli re-amplifikacijo (produkt izhodiščnega PCR je bil matrična DNA v naslednjem PCR),
 - izhodiščni temperaturni profil pomnoževanja spremenili v 'touch down' protokol (v prvih 15 ciklih smo v vsakem ciklu za 1°C znižali temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov, prvi cikel se je začel na 55°C, zadnji cikel se je končal na 40°C), nato je sledilo še 20 ciklov pomnoževanja pri temperaturi naleganja začetnih oligonukleotidov na 40°C,

- izhodiščni temperaturni profil pomnoževanja spremenili v 'touch up' protokol (v prvih desetih ciklih smo v vsakem ciklu za 1°C zvišali temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov, prvi cikel se je začel na 40°C, zadnji cikel se je končal na 50°C), nato je sledilo še 25 ciklov pomnoževanja pri temperaturi naleganja začetnih oligonukleotidov na 50°C.

3.2.4.2 Pomnoževanje markerjev ITS1, ITS2, 28S in 12S rDNA

Regijo ITS1 smo pri vseh meduzah pomnoževali s parom univerzalnih nevretenčarskih začetnih oligonukleotidov *its1* in *its2* (White in sod., 1990), ki omogočata pomnoževanje celotne regije ITS1. Vodilni začetni oligonukleotid *its1* je nalegal na koncu gena 18S rDNA, povratni začetni oligonukleotid *its2* je nalegal na začetku gena 5.8S rDNA.

vodilni začetni oligonukleotid - **its1** 5' GTTTCCGTAGGTGAACCTGC 3'
povratni začetni oligonukleotid - **its2** 5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3'

Regijo ITS2 smo pri vseh treh vrstah pomnoževali s parom univerzalnih nevretenčarskih začetnih oligonukleotidov *its3* in *its4* (White in sod., 1990), ki omogočata pomnoževanje celotne regije ITS2. Vodilni začetni oligonukleotid *its3* je nalegal na sredini gena 5.8S rDNA, povratni začetni oligonukleotid *its4* je nalegal na začetku gena 28S rDNA.

vodilni začetni oligonukleotid - **its3** 5' GCATCGATGAAGAACGCAGC 3'
povratni začetni oligonukleotid - **its4** 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

Regijo 28S rDNA smo pomnoževali s parom nevretenčarskih začetnih oligonukleotidov *28Slev2* in *28Sdes2* (Verovnik in sod., 2005; Zakšek in sod., 2007).

vodilni začetni oligonukleotid - **28Slev2** 5' CAAGTACCGTGAGGGGAAAGTT 3'
povratni začetni oligonukleotid - **28Sdes2** 5' GTTCACCATCTTTTCGGGTC 3'

Regijo 12S rDNA smo pomnoževali s parom univerzalnih nevretenčarskih začetnih oligonukleotidov *12Sa* in *12Sb* (Kocher in sod., 1989).

vodilni začetni oligonukleotid - **12Sa** 5' AAAACIIGGATTAGATACCC 3'
povratni začetni oligonukleotid - **12Sb** 5' GAGAGTGACGGGCGATGTGT 3'

Kot izhodišče za pomnoževanje vseh markerjev z jedrne DNA smo vzeli naslednje pogoje pomnoževanja:

- (a) Reakcijski volumen in sestava mešanice za PCR sta bila enaka, kot je opisano v poglavju 3.2.4.1 (a).
- (b) Vzorce smo pomnoževali po naslednjem protokolu: začetna 3-minutna denaturacija na 95°C, kateri je sledilo 35 ciklov sestavljenih po naslednji shemi: denaturacija na 95°C (1 minuta), prileganje na 48°C (1 minuta), podaljševanje na 72°C (90 sekund) in na koncu eno minutna inkubacija na 72°C. Pomnoževanje smo izvajali v cikličnih termostatih PTC-200 DNA (MJ Research, ZDA) in GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, ZDA).

- (c) Vzorcem, ki se ob začetnih pogojih pomnoževanja niso pomnožili ali pa je bilo pomnožene DNA zelo malo, smo spreminjali pogoje pomnoževanja, kot je opisano v poglavju 3.2.4.1 (c).

3.2.4.3 Čiščenje produktov PCR, določevanje in sestavljanje nukleotidnih zaporedij

Čiščenje produktov PCR in določevanje nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje) so naredili v podjetju Macrogen (Koreja). Pri sekvenciranju so uporabili enake začetne oligonukleotide, kot smo jih uporabili v PCR za pomnoževanje regij COI, ITS1 in ITS2 (poglavje 3.2.4.1 in 3.2.4.2). Rezultate sekvenciranja smo dobili v elektronski obliki v različnih računalniških formatih.

Nukleotidna zaporedja obeh matričnih verig (veriga narejena z vodilnim začetnim oligonukleotidom in veriga narejena s povratnim oligonukleotidom) smo s programom ChromasPro 1.34 (Technelysium Pty Ltd, Queensland, Avstralija) združili v eno sestavljeno zaporedje (angl. contig). Vsako sestavljeno zaporedje smo pregledali in ročno popravili nukleotidni zapis v primerih, kjer je bilo ob nesoglasjih nedvoumno možno določiti pravi nukleotid. V vsakem sestavljenem zaporedju smo nukleotidno zaporedje vodilnega in povratnega začetnega oligonukleotida odstranili, tako da je vsak zapis vseboval le nukleotidno zaporedje med obema začetnima oligonukleotidoma. Za vse nadaljne analize smo za vsak osebek uporabljali očiščen zapis sestavljenega zaporedja.

3.2.5 Analize nukleotidnih zaporedij

Za analize genetske diferenciacije klobučnjaških meduz smo uporabljali očiščena nukleotidna zaporedja mitohondrijske DNA (regija COI) in jedrne DNA (regiji ITS1 in ITS2). Analize smo delali ločeno za vsako regijo posebej in z zlepljenimi nukleotidnimi zaporedji obeh regij ITS in vseh treh regij COI-ITS1-ITS2.

3.2.5.1 Iskanje podobnih nukleotidnih zaporedij v podatkovnih bazah

Nukleotidna zaporedja smo pregledali z orodjem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul in sod., 1997) dosegljivim na strežniku Nacionalnega centra za biotehnoške informacije (NCBI, ZDA). V privzetih nastavitvah BLASTN algoritma smo naše nukleotidno zaporedje primerjali z nukleotidnimi zaporedji v celotni podatkovni zbirki nr (angl. Non-Redundant). Program v podatkovni zbirki nr NCBI poišče najbolj podobna zaporedja. Poleg izpisa najbolj podobnih nukleotidnih zaporedij, program izračuna in izpiše tudi bitne vrednosti (angl. bit scores) in E-vrednosti (angl. E-values).

Bitne vrednosti so izračunani rezultati poravnave, ki upoštevajo statistične lastnosti (parametra k , λ) ocenjenih matrik poravnave.

$$E = kmne^{-\lambda S}$$

S - rezultat poravnave

m,n - dolžina zaporedij

k , λ - parametra odvisna od sestave nukleotidov oz. aminokislin in ocenjevalne matrike

... (1)

E-vrednost predstavlja verjetnost, da po naključju najdemo zaporedje z enakim rezultatom poravnave v enako veliki podatkovni zbirki. $E > 0.01$ je statistično neznačilen, $E < 0.01$ naključna podobnost zelo redka in statistično značilna, $E < e^{-50}$ velika verjetnost, da sta zaporedji evolucijsko povezani.

3.2.5.2 Poravnava zaporedij

Nabor nukleotidnih zaporedij smo poravnali v programu Clustal X 1.8 (Thompson in sod., 1997), uporabljali smo nastavitev "multiple sequence alignment". Program temelji na distančni metodi izračunavanja razdalj (Needelman in Wunsch, 1970) in najbolj verjetna poravnava je tista, ki ima najmanjšo razdaljo (minimalno število neujemanj in vrzeli). Za določitev najprimernejše poravnave lahko spreminjamo uteži za ujemanja, neujemanja in vrzeli. V primeru težavnejših poravnav z zunanjimi skupinami (poravnave z veliko vrzeli) smo za uskladitev zaporedij uporabili program MAFFT (Katoh in sod., 2005). Po potrebi smo določene sklope poravnav še dodatno ročno popravili v programu BioEdit 7.0.9 (Hall, 1999).

Pri kodirajočih regijah COI smo funkcionalnost nukleotidnih poravnav potrdili s pretvorbo v aminokislinski zapis. Nukleotidne poravnave smo vnesli v program DAMBE 5.0.10 (Xia in Xie, 2001) in izbrali primeren genetski kod za prepis. V primeru klobučnjaških meduz je za regijo COI pravilen mitohondrijski genski kod za Coelenterata (MoldMtDNA ali Trans_Table=4), kjer se v 655bp dolgih nukleotidnih zaporedjih začne bralni okvir na drugem mestu. Nukleotidna poravnava je primerna, če aminokislinsko zaporedje ne vsebuje stop kodonov.

3.2.5.3 Filogenetske analize

S filogenetskimi analizami smo rekonstruirali sorodstvene odnose znotraj izbranih vrst klobučnjaških meduz. Filogenetska drevesa smo izdelali po treh metodah: metoda varčnosti, metoda največjega verjetja in Bayesovim pristopom.

Za vse filogenetske metode je značilno, da število možnih dreves izjemno narašča z večanjem števila OTE (Hall, 2008). Filogenetske analize tako hitro postanejo zahtevne in zato iskanje najboljšega drevesa z izbiro različnih algoritmov skrajšamo, da v nekem razumnem času dobimo najboljšo rekonstrukcijo sorodstvenih odnosov.

$$\text{Število dreves brez korenine: } \frac{(2s-5)!}{2^{s-3}(s-3)!} \quad s = \text{število OTE}$$

$$\text{Število dreves s korenino: } \frac{(2s-3)!}{2^{s-2}(s-2)!} \quad \dots (2)$$

Metoda varčnosti (Fitch, 1971) rekonstruira drevo iz neposrednega primerjanja nukleotidnih zaporedij. Temelji na načelu, da je najbolj verjetna evolucija tista z najmanjšim številom substitucij. V privzeti nastavitvi so vse substitucije enako verjetne, lahko pa nastavitve uskladimo z ugotovljenimi odstopanji posameznih substitucij ter jih temu primerno obtežimo. Za računanje vzamemo le informativna mesta. Nukleotidno mesto je informativno, če daje prednost določenemu drevesu v primerjavi z ostalimi drevesi. Za izdelavo dreves po metodi

varčnosti smo uporabljali program MEGA 5 (Tamura in sod., 2011). Drevesa smo iskali po hevrističnem načinu z izgradnjo izhodiščnega drevesa z naključnim dodajanjem haplotipov (angl. random addition). Hevristični način iskanja uporabljamo zato, ker je pri vzorcu, ki šteje več deset haplotipov število vseh možnih dreves tolikšno, da jih ne moremo preveriti. Pri tem načinu iskanja, preverimo podmnožico možnih dreves v upanju, da bomo z zadovoljivo verjetnostjo našli drevo največje varčnosti (Swofford in Sullivan, 2003). Rezultati iskanja so pokazali več možnih dreves, zato smo izdelali drevo 50 odstotnega večinskega soglasja. Na drevesu večinskega soglasja so prikazane samo dihrotomne cepitve, ki se pojavljajo pri več kot 50 % dreves, ostale veje so združene v politomije. Podporo posameznih razvejitev na najvarčnejših drevesih smo preverjali z "bootstrap" metodo ponovnega vzorčenja. Podporo razvejitev na osnovnem drevesu varčnosti smo ocenili s 500 ponovitvami.

Za izračunavanje dreves po metodi največjega verjetja in Bayesovem pristopu smo s programom Modelgenerator (Keane in sod., 2006) najprej določili najbolj primeren evolucijski model. Za nadaljnje analize smo uporabljali najbolj primeren model po Akaikovem informacijskem kriteriju (ACI; Akaike, 1973). Najbolj primeren model je tisti, ki čimbolj točno opiše stanje podatkov. Model vsebuje informacijo o frekvencah nukleotidov, verjetnosti posameznih substitucij, porazdelitvi pogostosti substitucij vzdolž nukleotidnega zaporedja in deležu nespremenljivih mest.

Metoda največjega verjetja (Felsenstein, 1981) išče drevo, ki po vnaprej določenem evolucijskem modelu z največjo verjetnostjo ustreza podatkom. Metoda je bila zelo počasna in zaradi tega dolga leta neprijetna, dokler Guindon in Gascuel (2003) nista razvila algoritma, ki je zelo skrajšal čas izračunavanja. Statistična osnova metode je zastavljena na računanju verjetja dreves in za končni rezultat izbere drevo z največjim verjetjem. Zaradi velikega števila možnih dreves, je nemogoče oceniti vsa drevesa, zato ponovno uporabimo hevristični način iskanja dreves. Za izdelavo dreves po metodi največjega verjetja smo uporabljali program MEGA 5 (Tamura in sod., 2011) z nastavitvijo hevrističnega načina iskanja dreves po metodi izmenjave najbližjih sosedov (angl. nearest neighbor interchange). Za vsak set podatkov smo pred računanjem nastavili najprimernejši model substitucij in diskretno aproksimacijo distribucije gamma (parameter α ; Yang, 1994). Program je izdelal začetno drevo, ki je bilo izhodišče pri iskanju najbolj verjetnega drevesa. Podporo posameznim razvejitvam na drevesih največjega verjetja smo preverjali z "bootstrap" metodo ponovnega vzorčenja. Podporo razvejitev na osnovnem drevesu verjetja smo ocenili s 1000 ponovitvami.

Bayesov pristop je novejša različica metode največjega verjetja. Namesto iskanja drevesa, ki povečuje verjetje glede na opazovane podatke, išče drevesa z najvišjo posteriorno verjetnostjo. Metoda določi množico dreves s približno enakimi verjetji. Bayesov pristop iskanja filogenetskega drevesa temelji na Bayesovem teoremu (Rannala in Yang, 1996):

$$P(T|X) = [P(X|T) \times P(T)] / P(X) \quad \dots (3)$$

$P(T)$ je apriorna verjetnost, ki jo pripišemo določeni topologiji drevesa. $P(X|T)$ je verjetje drevesa, ki je izračunano na podlagi najbolj primerne modela substitucije (v naši analizi predhodno določen s programom Modelgenerator). Pri danih podatkih $P(T|X)$ nato po Bayesovi enačbi izračunamo posteriorno verjetnost drevesa $P(X)$. Najboljše drevo je drevo z največjo vrednostjo posteriorne verjetnosti. Dejansko je nemogoče izračunati posteriorne

verjetnosti vsem možnim drevesom, zato uporabimo aproksimacijski algoritem MCMC (angl. Monte Carlo Markov Chain; povzeto po Huelsenbeck in sod., 2001). Za izdelavo dreves po Bayesovem pristopu smo uporabljali program MrBayes 3.1 (Ronquist in Huelsenbeck, 2003) z nastavitvijo načina iskanja dreves po združeni metodi Metropolis – MCMC (Metropolis in sod, 1953; Hastings, 1970). Istočasno smo izvajali dve iskanji s hkratnim vzorčenjem dreves iz štirih verig po 2×10^6 generacij, z nastavitvijo zapisa vzorčenja na vsakih 100 generacij. Vzorčenje posteriornih verjetnosti dreves se lahko začne, ko veriga doseže stacionarnost oz. ko se ocene posteriornih verjetnosti ne spreminjajo več bistveno. Stacionarnost posteriornih verjetnosti smo preverili s programom TRACER 1.4 (Rambaut in Drummond, 2009). Drevo 50 odstotnega večinskega soglasja smo izračunali na osnovi zadnjih 25 % dreves iz vzorca 20000 dreves od vsake simulacije. Iz preostalih 10000 dreves (5000 dreves od vsake simulacije) smo izračunali posteriorno verjetnost drevesa soglasja. Sorodstvene odnose med haplotipi, ki smo jih izračunali v programu MrBayes 3.1, smo grafično izrisali s programom FigTree 1.2.2 (Rambaut, 2006).

3.2.5.4 Mreže haplotipov

Sorodstvene odnose znotraj vrste smo lahko natančneje predstavili z mrežami haplotipov, ki smo jih izdelali s programoma Network 4.5.0 (www.fluxus-engineering.com) in TCS 1.21 (Clement in sod., 2000).

Sorodstveni odnosi znotraj vrste so pogosto bolj jasno in natančno predstavljeni z mrežami haplotipov. V primeru znotraj vrstnih zaporedij DNA imamo običajno veliko podobnih zaporedij, med katerimi so nekateri haplotipi lahko predniški haplotipi. Bolj verjetno je, da genski pretok znotraj vrste poteka v obliki mrež, kot pa v obliki hierarhične drevesu podobne strukture. Mreže haplotipov so grafi sestavljeni iz točk in daljic. Točke lahko predstavljajo hipotetične prednike ali dejansko opažene haplotipe. Velikost točke je premosorazmerna s frekvenco haplotipa in z različno obarvanostjo točk običajno ponazarjamo geografski izvor haplotipov (povzeto po Posada in Crandall, 2001). Ocenjevanje sorodstvenih odnosov med geni na nivoju populacij s filogenetskimi metodami (metoda varčnosti, metoda največjega verjetja, itd.) je lahko težavno in nepopolno (Clement in sod., 2000). Filogenetske metode namreč zahtevajo večje število variabilnih znakov za natančno rekonstrukcijo sorodstvenih odnosov (Huelsenbeck in Hillis, 1993). Zato je načeloma njihova uporaba v populacijskih študijah neprimerna, ker je variabilnost na populacijskem nivoju manjša. Poleg tega je na populacijskem nivoju rekombinacija precej pogost in verjeten pojav, medtem ko filogenetske metode predpostavljajo, da se rekombinacija ne pojavlja (Clement in sod., 2000).

TCS 1.21 je programski paket, ki temelji na metodi Tempeltona in sodelavcev (1992) za določevanje sorodstvenih odnosov med populacijami na osnovi nukleotidnih zaporedij, kadar je v populaciji manjša raznolikost. Program izriše mrežo haplotipov po statističnem kriteriju varčnosti. Naredili smo ločene mreže haplotipov za COI in ITS sklope podatkov. Glede na rezultate iz filogenetskih analiz smo naredili še mreže za posamezne močno podprte filogenetske skupine. Za izračunavanje smo uporabili privzete nastavitve programa. Enake sklope podatkov smo vnesli tudi v program Network 4.5.0, ki je naredil "median-joining" mreže haplotipov. Za računanje mrež smo enako obtežili vsa mesta, spreminjali pa smo vrednosti parametra za nivo homoplazije (ϵ). Mreže, ki so kljub spreminjanju parametrov še vedno kazale veliko stopnjo zamreženosti, smo poskušali ročno razrešiti s popravki, ki jih predlagata Pfenninger in Posada (2002). Na ta način lahko razrešimo mrežo, ki ima manjše

število enostavnih zank, tako da pri tem upoštevamo frekvenco, topologijo in geografski izvor haplotipov. V našem primeru je bila večina mrež preveč zamreženih, da bi jih lahko razrešili.

3.2.5.5 Analize nukleotidnih zaporedij in populacijsko genetske analize

Analize, s katerimi smo testirali genetsko strukturiranje populacij, smo delali ločeno na mitohondrijskih (COI) in jedrnih (ITS1, ITS2) genetskih markerjih. V analizah moramo upoštevati njihov različen način dedovanja: regije COI imajo klonsko, maternalno dedovanje brez rekombinacij, regije ITS imajo visoko stopnjo rekombinacije. Genetski markerji se razlikujejo glede na stopnjo substitucij in nukleotidno sestavo zaporedij, zato smo za vsak marker uporabili model, ki najbolje opiše podatke. Programa za izračunavanje genetskih parametrov ARLEQUIN 3.1 (Excoffier in sod., 1992) in DAMBE 5.0.10 (Xia in Xie, 2001) imata omejeno število modelov, zato na osnovi predhodno izračunanega optimalnega modela v programu Modelgenerator, med podanimi modeli izberemo najbolj podoben model. Tako smo pri nastavitvah parametrov izračunavanja za COI uporabljali Kimurin dvoparametrični model, za regije ITS pa model po Tamura in Nei. Kimurin dvoparametrični model (K80; Kimura, 1980) predvideva enake frekvence nukleotidov in dopušča možnost, da se frekvence tranzicij in transverzij lahko razlikujejo. Običajno so tranzicije pogostejše od transverzij. Model zato izračunava genetske razdalje po dveh različnih stopnjah: α – stopnja tranzicij, β – stopnja transverzij. Model TN93 (Tamura in Nei, 1993) je bolj kompleksen model od modela K80, saj predvideva različne frekvence nukleotidov in upošteva različne stopnje substitucij tako med tranzicijami in transverzijami kot še dodatno med purini in med pirimidini.

V programu DAMBE 5.0.10 (Xia in Xie, 2001) smo najprej s spreminjanjem števila opaženih substitucij glede na genetske razdalje K80 oz. TN93 grafično preverili nasičenost sekvenc s substitucijami. Nato smo še dodatno preverili nasičenost nukleotidnih zaporedij s testom za izračunavanje indeksa substitucijske nasičenosti (Iss), ki primerja opažen Iss s kritično vrednostjo Iss (Iss.c.). Pri nukleotidnih zaporedjih, ki niso nasičena s substitucijami, je Iss značilno statistično manjši od Iss.c. (Xia in sod., 2003). Prav tako smo v programu DAMBE 5.0.10 s testom χ^2 primerjali še skladnost nukleotidnih zaporedij glede na frekvence pojavljanja posameznih nukleotidov. Podatke o nukleotidni sestavi zaporedij in številu variabilnih mest znotraj geografsko ali filogenetsko določenih skupin smo izračunali s programom DNAsp v5 (Librado in Rozas, 2009). V tem programu smo izračunali tudi osnovna indeksa genetske raznolikosti – nukleotidno (π) in haplotipsko (h) raznolikost. Deleže razlik v nukleotidnih zaporedjih med filogenetskimi skupinami smo izračunali s programom BioEdit 7.0.9, še boljše pa genetsko raznolikost podatkov opišemo s parnimi genetskimi razdaljami (angl. pairwise differences). S programom ARLEQUIN 3.1 (Excoffier in sod., 1992) smo izračunali parne Φ_{ST} vrednosti na osnovi 10000 permutacij in z analizo molekulske variance (AMOVA) določili delež variacije znotraj in med geografskimi ali filogenetskimi skupinami. V programu MEGA 5 (Tamura in sod., 2011) smo za regije COI na osnovi razmerja med sinonimnimi in nesinonimnimi substitucijami s testom Z preverili selekcijsko nevtralnost zaporedja.

Vzorec demografske preteklosti populacij na različnih geografskih območjih smo ugotavljali s testi za nevtralno evolucijo. V programu DNAsp v5 smo izračunali vrednosti Tajima D (Tajima, 1989), Fu F_S (Fu, 1997) in R_2 (Ramos-Onsins in Rozas, 2002). Statistični test Tajima D primerja število polimorfnihih mest in povprečno število mutacij med pari zaporedij.

Če sta vrednosti podobni, potem lahko potrdimo hipotezo o nevtralni evoluciji. Testa F_S in R_2 sta še močnejši orodji za testiranje stabilne velikosti populacije vs. populacijske rasti (Ramos-Onsins in Rozas, 2002). Razporeditev neujemanj haplotipov (angl. mismatch distribution) je še dodatna mera, ki ponazarja vzorec rasti oz. stabilne velikosti populacije (Rogers in Harpending, 1992). Grafe razporeditev neujemanj smo naredili v programu DNAsp v5.

Pri mitohondrijskih haplotipih lahko informacijo o demografski preteklosti populacij razberemo tudi iz efektivne velikosti populacije (N_e). Vendar je efektivna velikost populacije odvisna od hitrosti mutacij, ki pa pri meduzah ni znana (Dawson in Jacobs, 2001; Holland in sod., 2004; Huang in sod., 2008). Zaradi zgoraj navedenih omejitev, ne moremo verodostojno določiti efektivnih velikosti populacij, lahko pa preverimo, če imamo pristransko uporabo kodonov (angl. codon usage bias). Na pristransko uporabo kodonov lahko vplivajo selekcija, genetski drift in mutacije (McVean in Vieira, 2001). Učinek genetskega drifta je večji v majhnih populacijah, medtem ko v večjih populacijah prevladuje učinek selekcije (Bulmer, 1991). Tako naj bi v manjših populacijah zasledili nižjo pristransko uporabo kodonov, v večjih populacijah pa večjo. Za merilo pristranske uporabe kodonov smo v programu DNAsp v5 izračunali efektivno število kodonov (ENC; Novembre, 2002).

Skladnost populacij oz. filogenetskih skupin z geografsko razporeditvijo smo testirali z modelom izolacije zaradi oddaljenosti (angl. Isolation By Distance – IBD; Kimura in Weiss, 1964) v programu ARLEQUIN 3.1. Z Mantelovim testom smo testirali izolacijo glede na geografske razdalje in parne Φ_{ST} vrednosti na osnovi 1000 permutacij. Za izračun Mantelovega testa smo potrebovali matriko z geografskimi koordinatami vzorčnih mest. Pri uhatem klobučnjaku smo dodatno testirali še korelacijo med genetskimi razdaljami in najnižjo temperaturo morja na geografskem območju v zimskem obdobju. Pripravili smo matriko najnižjih morskih temperatur na vzorčevanih lokacijah in z Mantelovim testom izračunali korelacijo na osnovi 1000 permutacij. Pri mesečinki nobena od zgoraj navedenih analiz ni pokazala geografske strukturiranosti populacij, zato smo s programom SAMOVA 1.0 (Dupanloup in sod., 2002) naredili še dodaten test. S prostorsko analizo molekulske variance (SAMOVA) smo s spreminjanjem parametra števila skupin ($K = 2,3,4$) iskali morebitne možne večje skupine populacij. Program je za računanje korelacije med genetskimi in geografskimi razdaljami potreboval matriko z geografskimi koordinatami vzorčnih mest in Arlequinovo obliko datoteke.

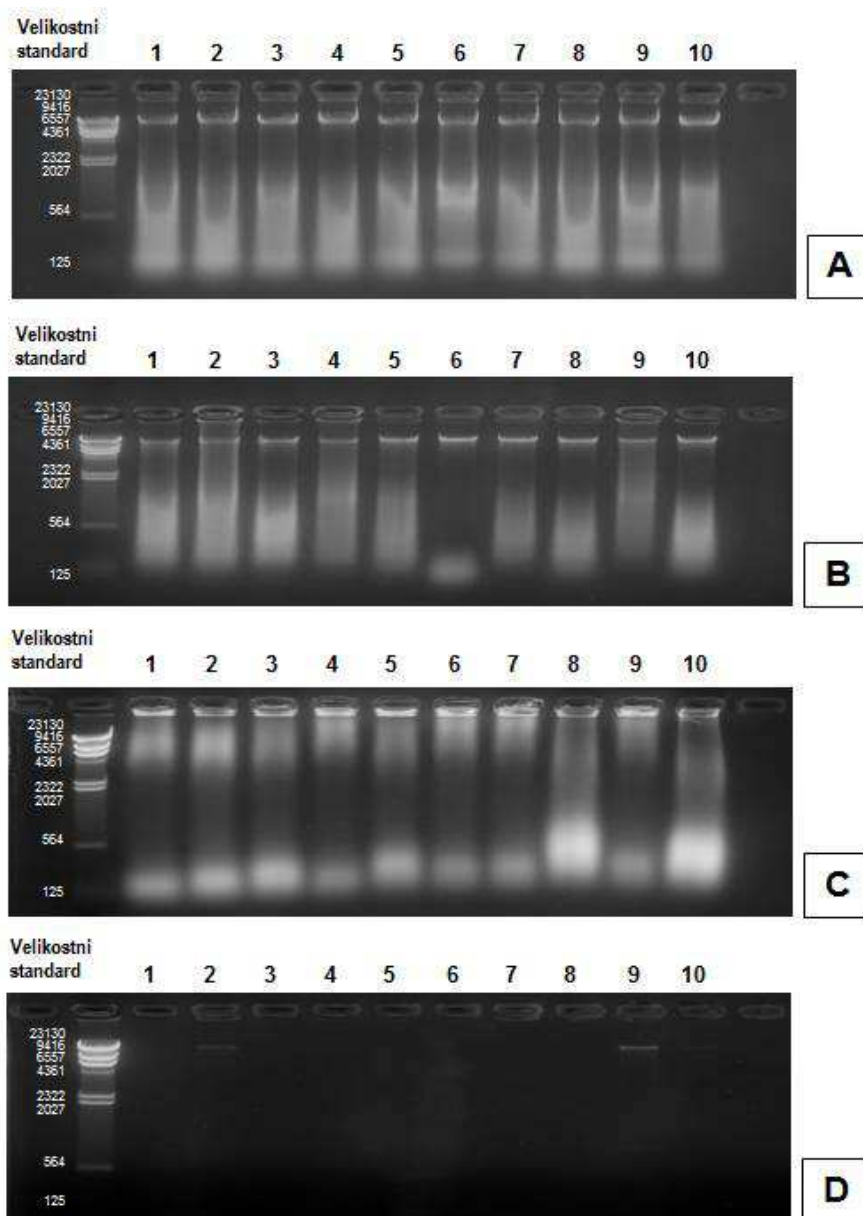
4 REZULTATI

4.1 OPTIMIZACIJA IZOLACIJE DNA IZ TKIVA MEDUZ

Uspešno smo izolirali DNA iz tkiva gonad in roba klobuka odraslih klobučnjaških meduz iz naslednjih vrst: mesečinka, uhati in veliki klobučnjak. Kvaliteta in količina izolirane DNA je primerljiva med obema tkivoma, saj po pregledu vseh izolacij DNA klobučnjaških meduz v zbirki vzorcev MBP nismo zasledili očitnih razlik. Majhne količine DNA pa smo izolirali iz mezogleje (notranji del obustnih ramen ali klobuka meduze).

Kot konzervans, v katerem so bili hranjeni koščki meduz pred izolacijo DNA, smo uporabljali večinoma 96 % etanol. Nekaj vzorcev je bilo shranjenih tudi v raztopini DMSO/NaCl in 100 % acetonu. Kvalitetnejšo DNA smo izolirali iz vzorcev, ki so bili takoj po vzorčevanju hranjeni v tekočem dušiku ali na -80°C . Pri večini tako hranjenih vzorcev smo ne glede na uporabljeni konzervans izolirali veliko visoko molekularne DNA. Vzorci, ki so bili dalj časa hranjeni na sobni temperaturi, so imeli boljše izolacije, če so bili hranjeni v 96 % etanolu ali v 100 % acetonu kot pa v raztopini DMSO/NaCl. Zelo slabo kvalitetne DNA (fragmenti majhne velikosti) smo dobili pri izolacijah vzorcev, ki so bili dalj časa hranjeni na sobni temperaturi zaradi dolgega transporta iz tujine.

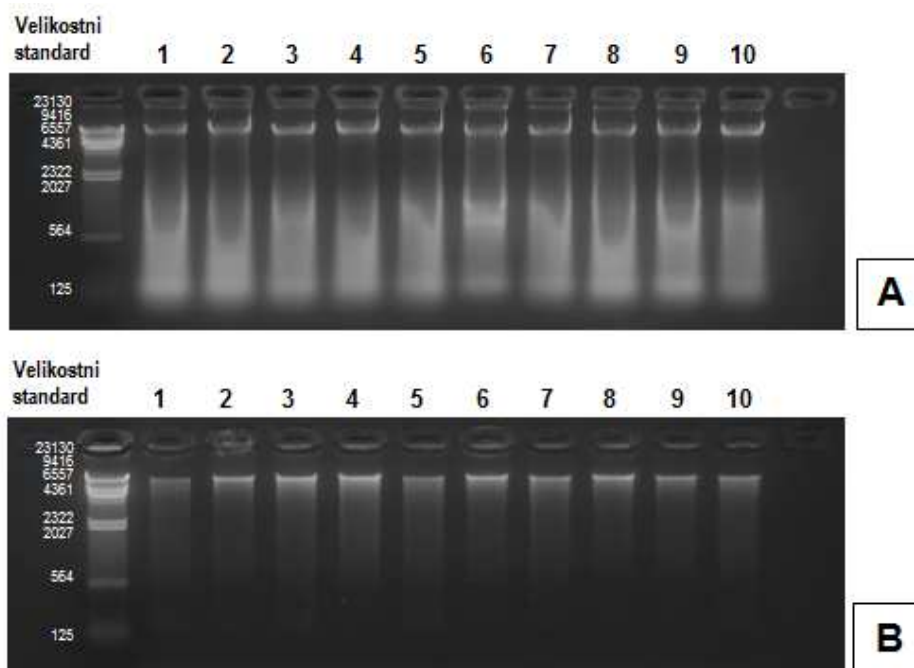
Primerjava uspešnosti različnih metod za izolacijo DNA je prikazana na Sliki 9. Na desetih odraslih osebkih mesečinke (na Sliki 9 označeni pod številkami od 1 – 10; v zbirki MBP kot vzorci pod oznako 16/06/PN 18-27) smo testirali kvaliteto in količino izbranih metod izolacije. Kot zelo učinkovite in primerljive metode izolacije DNA so se izkazale metode s CTAB (Slika 9A, 1,18 – 2,97 μg DNA), DNeasy Blood and Tissue Kitom (Slika 9B, 1,71 – 3,14 μg DNA) in Chelex 100 (Slika 9C, 1,93 – 4,16 μg DNA), medtem ko z izolacijo DNA na osnovi magnetnih delcev pridobimo zelo čisto in kvalitetno DNA, vendar v zelo nizkih koncentracijah (Slika 9D - slabo opazne lise na agaroznem gelu in izmerjene količine DNA v obsegu 0,03 – 0,41 μg). Najbolj uspešno smo s PCR pomnoževali vzorce izolirane z DNeasy Blood and Tissue Kitom, medtem ko smo v vzorcih izoliranih po metodi s CTAB večkrat imeli težave pri pomnoževanju v PCR (slabo pomnoževanje ali neuspešno pomnoževanje). Vzorci DNA izolirani po metodi s CTAB so bili problematični tudi zaradi slabšega raztapljanja in nižje čistosti peletov DNA. Na osnovi teh dejstev smo večino vzorcev klobučnjaških meduz izolirali po metodi z DNeasy Blood and Tissue Kitom.



Slika 9: Primerjava izolacij DNA iz desetih mesečink: (A) z metodo CTAB, (B) z metodo DNeasy Blood and Tissue Kit, (C) z metodo Chelex 100, (D) z metodo Wizard Magnetic DNA Purification System for Food. Na prvi stezi agaroznega gela je naložen velikostni standard Lambda DNA/Hind III (Promega). Na preostalih stezah je naloženo po 5 μ l DNA.

Figure 9: Comparison of DNA isolations from ten medusae of mauve stinger: (A) CTAB method, (B) DNeasy Blood and Tissue Kit, (C) Chelex 100 method, (D) method Wizard Magnetic DNA Purification System for Food. On all agarose gels the first line contain size marker Lambda DNA/Hind III (Promega) and the rest lines contain 5 μ l of DNA.

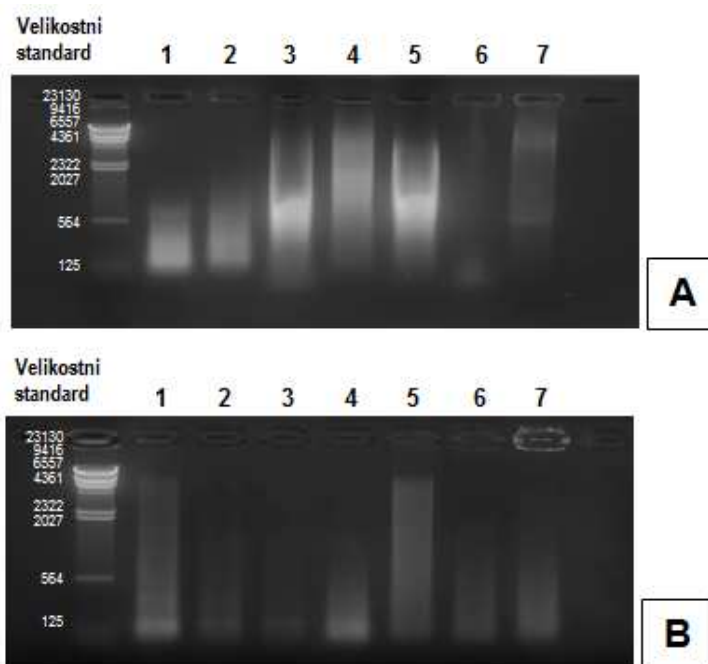
Nato smo preverili ali so nizko molekularni fragmenti v celokupnem izolatu DNA res nizko molekularni fragmenti DNA ali so ostanki RNA. Na Sliki 10 je prikazana izolacija genomske DNA pred dodatkom encima RNaze A (Slika 10A) in po obdelavi z RNazo A (Slika 10B). Ugotovili smo, da se poleg DNA oborijo velike količine RNA (po dodatku RNaze A na agaroznem gelu ni več krajših fragmentov). Merjenje koncentracije DNA brez dodatka RNaze A pokaže tudi od 2,5 do 3 krat višje vrednosti gDNA kot po dodatku RNaze A (brez RNaze A: 1,04 – 6,24 µg DNA, z RNazo A: 0,43 – 2,22 µg DNA).



Slika 10: Primerjava izolacij fragmentov DNA iz tkiv desetih mesečink z metodo DNeasy Blood and Tissue Kit: (A) brez dodatka RNaze A, (B) po dodatku RNaze A. Na prvi stezi agaroznega gela je naložen velikostni standard Lamba DNA/Hind III (Promega). Na preostalih stezah je naloženo po 5µl DNA.

Figure 10: Comparison of DNA fragments isolation from tissues of ten mauve stingers with method DNeasy Blood and Tissue Kit: (A) without RNase A, (B) with RNase A. On both agarose gels the first line contain size marker Lambda DNA/Hind III (Promega) and the rest lines contain 5µl of DNA.

Za izolacijo genomske DNA smo pri sedmih vzorcih mesečink (24/09/PN 11 - 17) poleg v 96 % etanolu konzerviranega tkiva z roba klobuka imeli na razpolago tudi liofilizirane vzorce celotne odrasle meduze. Primerjali smo kvaliteto fragmentov DNA po izolacijah DNA iz 25 mg vzorcev liofiliziranih meduz (Slika 11A) in 25 mg vzorcev konzerviranega tkiva (Slika 11B). Ugotovili smo, da iz liofiliziranih vzorcev dobimo fragmente DNA primerljive kakovosti kot po izolaciji iz konzerviranih tkiv. Koncentracije izolirane DNA iz liofiliziranih meduz so lahko tudi do 5 krat višje od koncentracij DNA po izolaciji DNA iz enake teže konzerviranih tkiv (0,8 – 17,6 µg DNA iz liofiliziranih vzorcev, 0,16 – 3,54 µg DNA iz konzerviranih tkivnih vzorcev).



Slika 11: Primerjava kvalitete fragmentov DNA iz sedmih osebkov odraslih mesečink po izolaciji z metodo DNeasy Blood and Tissue Kit in dodatkom RNaze A: (A) iz 25 mg vzorca liofilizirane meduze, (B) iz 25 mg konzerviranega tkiva. Na prvi stezi agaroznega gela je naložen velikostni standard Lamba DNA/Hind III (Promega). Na preostalih stezah je naloženo po 5 μ l DNA.

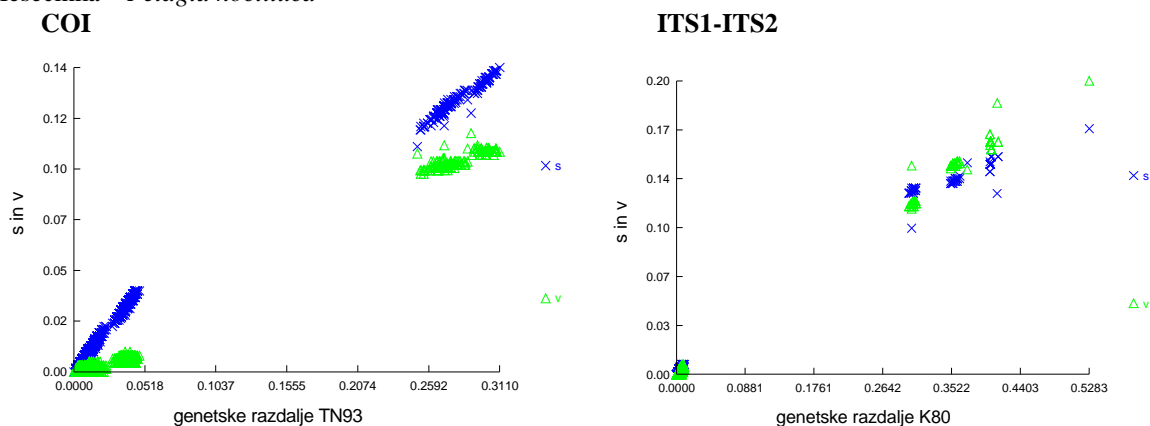
Figure 11: Comparison of DNA fragments quality from seven adult medusae of mauve stinger after isolation with DNeasy Blood and Tissue Kit and addition of RNase A: (A) from 25 mg of liophilised medusae sample, (B) from 25 mg of preserved tissue. On both agarose gels the first line contain size marker Lambda DNA/Hind III (Promega) and the rest lines contain 5 μ l of DNA.

4.2 VARIABILNOST NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ

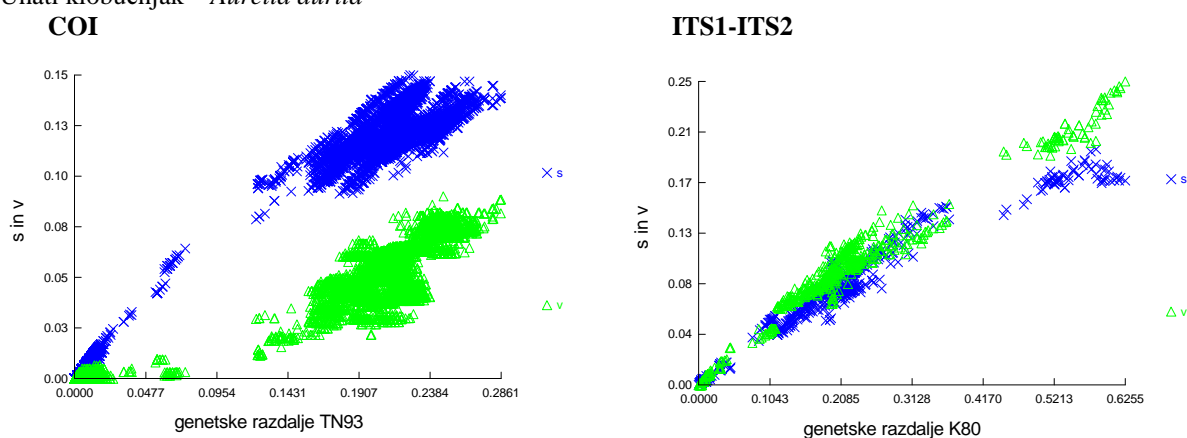
Najprej smo na vzorcih mesečinke testirali variabilnost petih različnih genetskih markerjev (COI, ITS1, ITS2, 12S in 28S rDNA). Test smo delali na osebkih iz severnega Jadrana (vzorec PN1107), južnega Jadrana (vzorca PN0803 in PN0804) in zahodnega Sredozemlja (vzorec PN1307). Uspešno smo pomnožili in sekvencirali 655 bp dolg fragment COI, 280 bp dolg fragment ITS1, 365 bp dolg fragment ITS2, 386 bp dolg fragment 12S in 630 bp dolg fragment 28S. V regijah COI, ITS1 in ITS2 smo zasledili variabilnost v nukleotidnih zaporedjih, medtem ko v regijah 12S in 28S rDNA nismo zasledili nobene variabilnosti in so bila vsa nukleotidna zaporedja popolnoma enaka. Na osnovi teh rezultatov smo za vse filogenetske in populacijske analize uporabili del mitohondrijskega gena COI in regiji ITS1 in ITS2, ki sta zapisani na operonih za ribosomalne RNA v jedrnem genomu.

Na Sliki 12 je prikazano razmerje med substitucijami v regijah COI in ITS pri vseh treh proučevanih vrstah meduz. Število obeh tipov substitucij (transverzij in tranzicij) linearno narašča z večanjem genetske razdalje, kar kaže na to, da nukleotidna zaporedja niso nasičena s substitucijami.

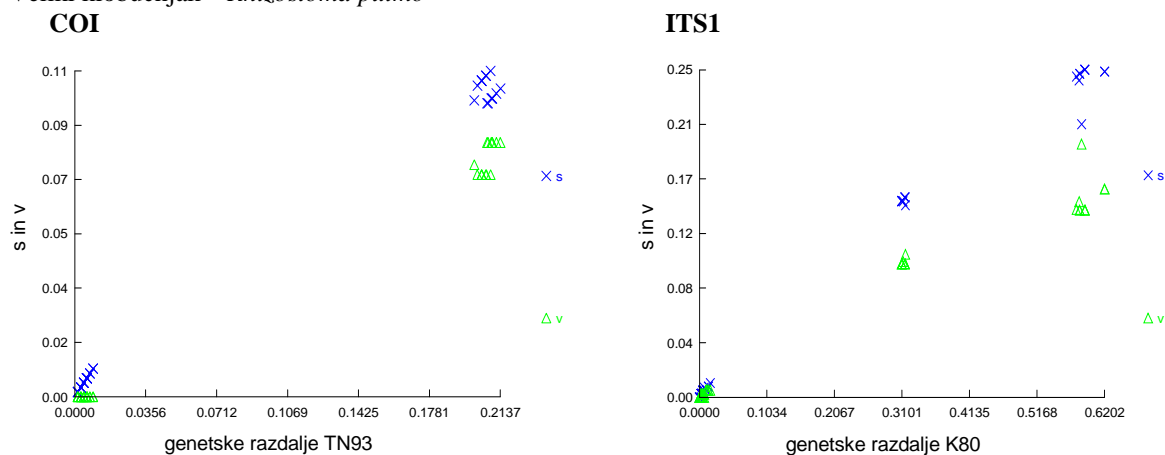
Mesečinka – *Pelagia noctiluca*



Uhati klobučnjak – *Aurelia aurita*



Veliki klobučnjak – *Rhizostoma pulmo*



Slika 12: Število substitucij – tranzicij (Xs) in transverzij (Δv) - glede na genetske razdalje med haplotipi: levo - Tamura in Nei genetske razdalje (TN93) med haplotipi COI in zunanji skupinami, desno - Kimura dvoparametrične genetske razdalje (K80) med haplotipi ITS in zunanji skupinami.

Figure 12: Number of substitutions – transitions (Xs) and transversions (Δv) – based on genetic differences among haplotypes: left - Tamura and Nei genetic differences (TN93) among COI haplotypes and outgroups, right - Kimura twoparametric genetic differences (K80) among ITS haplotypes and outgroups.

Test Iss (Xia in sod, 2003) je pri mesečinkah potrdil nenasičenost nukleotidnih zaporedij s substitucijami v COI (Iss = 0,020, Iss.c. = 0,764, s.p. = 654, P = 0) in ITS (Iss = 0,007, Iss.c. = 0,722, s.p. = 576, P = 0). Prav tako smo pri velikih klobučnjakih v COI (Iss = 0,006, Iss.c. = 0,765, s.p. = 654, P = 0) in ITS (Iss = 0,101, Iss.c. = 0,729, s.p. = 416, P = 0) potrdili nenasičenost nukleotidnih zaporedij s substitucijami. Pri uhatih klobučnjakih smo nenasičenost nukleotidnih zaporedij s substitucijami potrdili v regiji COI (Iss = 0,547, Iss.c. = 0,763, s.p. = 247, P = 0). Regije ITS pa so pri uhatih klobučnjakih bolj nasičene s substitucijami (Iss = 0,882, Iss.c. = 0,792, s.p. = 1103, P > 0.1) in zato niso najbolj primerne za filogenetske analize.

4.3 GENETSKA DIFERENCIACIJA V MESEČINKI (*Pelagia noctiluca*)

Pri 144 osebkih mesečink iz 13 lokacij smo z začetnima oligonukleotidoma LCO1490 in HCO2198 (Folmer in sod., 1994) uspešno pomnožili in sekvencirali 655 bp dolg fragment mitohondrijskega gena COI (Preglednica 2). Vsa nukleotidna zaporedja COI so po preverjanju podobnosti nukleotidnih zaporedij z orodjem BLAST kazala največjo podobnost z regijo COI kompasne meduze in uhatega klobučnjaka. Po usklajevanju nukleotidnih zaporedij smo določili 108 različnih haplotipov (Priloga A). V tej regiji je bilo določenih 110 variabilnih mest, od tega 62 informativnih po kriteriju varčnosti (Priloga B1). Nadaljnje preverjanje pravilnosti nukleotidne poravnave z določanjem aminokislinske identitete po kodu za mtDNA "Coelenterata" je bilo uspešno za vsa zaporedja, saj zaporedja niso vsebovala stop kodonov.

Ugotavljanje podobnosti nukleotidnih zaporedij ITS z orodjem BLAST je pokazalo največjo podobnost z regijami ITS kompasne meduze in uhatega klobučnjaka. V poravnava oba zaporedja ITS nismo zasledili nobenega dolžinskega polimorfizma. K variabilnosti regij so prispevale le točkovne mutacije (Priloga B2 in B3). V 280 bp dolgi regiji ITS1 je bilo v 103 osebkih določenih 14 različnih haplotipov, v 365 bp dolgi regiji ITS2 pa v 131 osebkih 23 različnih haplotipov. Združeni regiji ITS1-ITS2 sta tvorili 28 različnih haplotipov enotne dolžine 645 bp z 22 variabilnimi mesti, od teh je bilo 8 informativnih po kriteriju varčnosti.

Analize molekulske variance (AMOVA) v regijah COI in ITS kažejo večjo raznolikost znotraj populacij kot med populacijami (glej % raznolikosti znotraj/med skupinami geografskih območij v Preglednici 4). Rezultati izračunov genetske raznolikosti mesečinke med šestimi geografskimi območji v evropskih morjih in severozahodnem Atlantiku so prikazani v Preglednici 2. Vse mere genetske raznolikosti (h , π in število privatnih haplotipov) kažejo na večjo raznolikost regije COI kot regij ITS. Nukleotidni raznolikosti COI in ITS sta v močni korelaciji (Spearmanov korelacijski koeficient $r_s = 0,83$), medtem ko haplotipski raznolikosti COI in ITS nista v korelaciji ($r_s = -0,2$). Skupna haplotipska raznolikost v regiji COI je 0,958, v regijah ITS pa 0,723. Največja haplotipska raznolikost COI in ITS je bila najdena na območju severnega Atlantika (COI: 0,991, ITS: 0,895). Skupna nukleotidna raznolikost v regiji COI znaša 1,16 % in je večja kot v regijah ITS (0,31 %). Največjo nukleotidno raznolikost COI zasledimo na območju južnega Jadrana (1,82 %), največjo nukleotidno raznolikost ITS na območju severnega Atlantika (0,69 %). Klad I in klad II, ki izhajata iz rezultatov filogenetske analize COI (Slika 20), imata zelo podobno haplotipsko (I: 0,949, II: 0,989) in nukleotidno (I: 0,64, II: 0,59) raznolikost, čeprav se običutno razlikujeta v velikosti vzorca (14 proti 134).

Preglednica 2: Mesečinka - raznolikost v nukleotidnih zaporedjih COI in ITS glede na geografske regije.

Table 2: *Pelagia noctiluca* - genetic diversity in COI and ITS sequences according to geographic region.

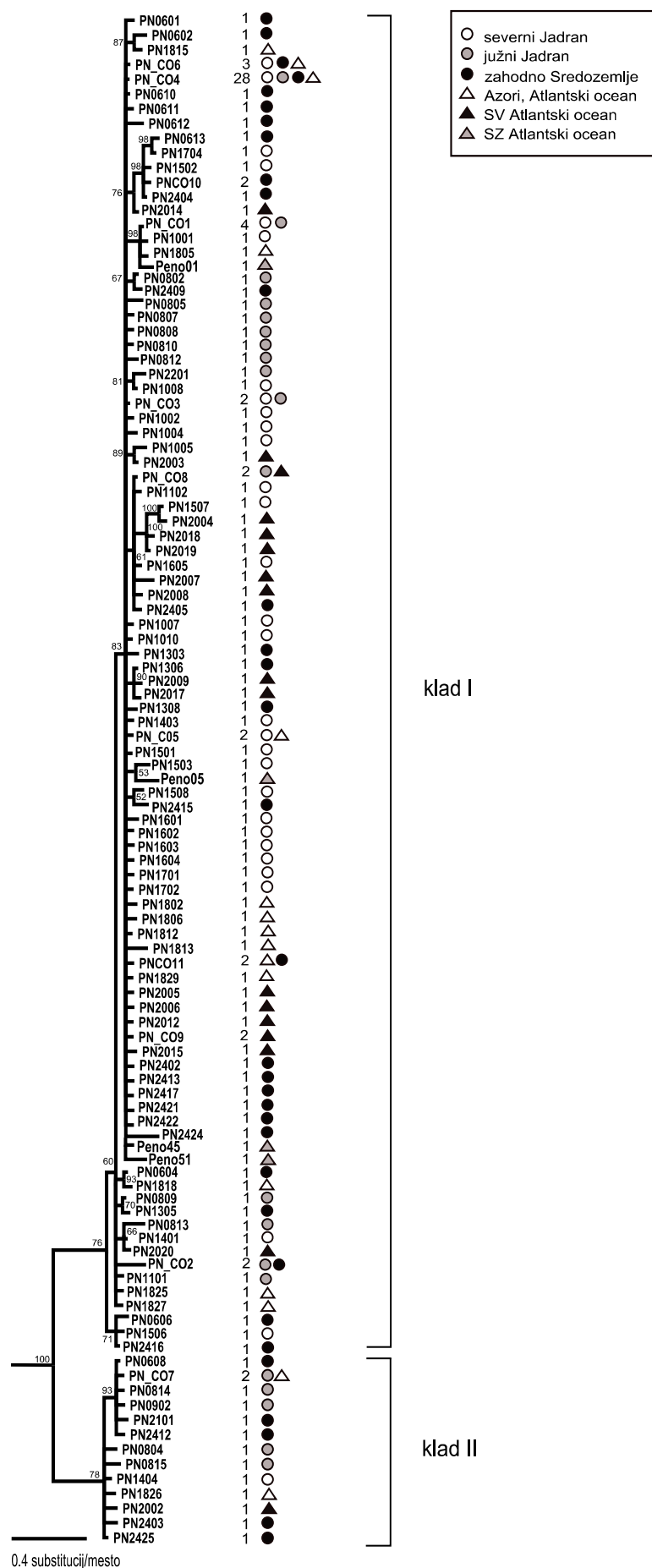
geografska regija	število osebkov		število haplotipov*		haplotipska raznolikost h		nukleotidna raznolikost π [%]	
	COI	ITS	COI	ITS	COI	ITS	COI	ITS
Severni Jadran	40	36	32 (26)	15 (6)	0,963	0,835	0,68	0,26
Južni Jadran	23	13	18 (13)	8 (2)	0,957	0,800	1,82	0,25
Zahodno Sredozemlje	43	40	33 (31)	15 (10)	0,949	0,647	1,26	0,31
Azori, Atlantik	20	16	16 (12)	7 (3)	0,947	0,671	1,16	0,22
Severni Atlantik	22	18	21 (20)	12 (6)	0,991	0,895	1,04	0,69
Klad I	134	-	91	-	0,949	-	0,64	-
Klad II	14	-	13	-	0,989	-	0,59	-
Skupaj	148	131	104	36	0,958	0,723	1,16	0,31

* v oklepajih je navedeno število privatnih haplotipov

Za koreninjenje dreves smo uporabili homologna zaporedja sorodnih taksonov: *Chrysaora* sp. (Pelagiidae), *Cyanea capillata* (Cyaneidae), *Aurelia aurita* (Ulmaridae). Vključujoč zunanje skupine je analiza variabilnih pozicij COI odkrila 234 variabilnih mest, od tega je 150 mest informativnih po kriteriju varčnosti. Za mesečinke je v regiji COI značilna nukleotidna sestava z visoko zastopanostjo timina (34,9 %), v primerjavi z adeninom (29,2 %), citozinom (18,4 %) in gvaninom (17,5 %). Razlike v nukleotidni sestavi med haplotipi COI niso statistično značilne ($\chi^2 = 6,41$, s.p. = 321, $P = 1$). Ocenjena vrednost parametra α je bila 0,16. Kot najboljši evlucijski model substitucije je bil določen model K81. Ta model upošteva razlike v frekvencah nukleotidov, enak nivo tranzicij in dva nivoja transverzij (Kimura, 1981).

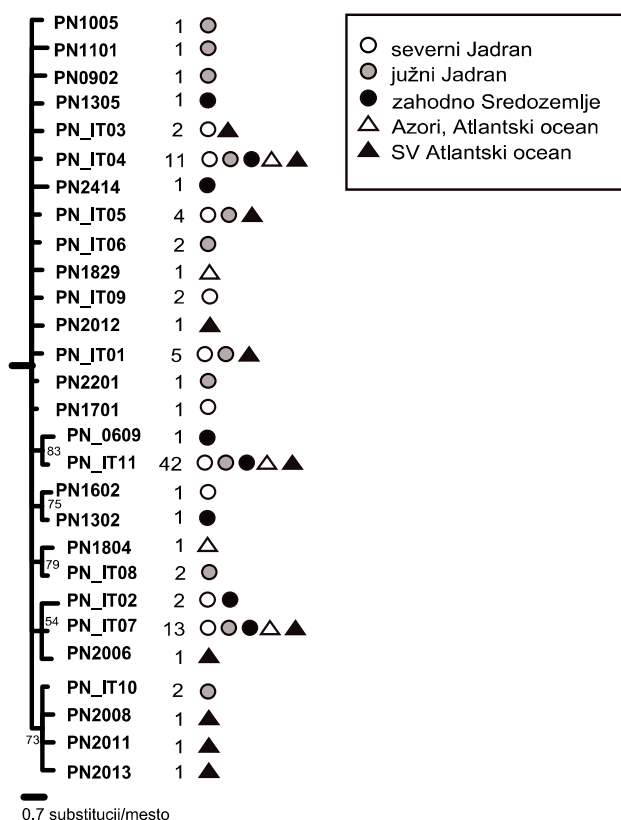
Pri regijah ITS je vključujoč z zunanjimi skupinami analiza variabilnih pozicij odkrila 213 variabilnih mest, od tega je 59 mest informativnih po kriteriju varčnosti. Značilna nukleotidna sestava regij ITS ima uravnoteženo zastopanost vseh nukleotidov: timin (29,0 %), adenin (25,5 %), citozin (22,1 %) in gvanin (23,4 %). Nukleotidna sestava med haplotipi ITS je homogena ($\chi^2 = 6,41$, s.p. = 321, $P = 1$). Ocenjena vrednost parametra α je bila 0,34. Za najboljši evlucijski model substitucije je bil določen preprost model K80+G, ki upošteva razlike v frekvencah tranzicij in transverzij ob upoštevanju razlik v hitrosti substitucij med posameznimi pozicijami v zaporedju (Kimura, 1980).

Filogenetsko analizo smo izvedli po Bayesovi metodi, metodi varčnosti in metodi največjega verjetja za vse tri kombinacije nukleotidnih zaporedij (COI, ITS1-ITS2, COI-ITS1-ITS2). Drevesa po metodi varčnosti in metodi največjega verjetja niso posebej prikazana, ker imajo podobno topologijo in podporo razvejitev kot drevesa po Bayesovem pristopu. Filogenetska analiza na osnovi nukleotidnih zaporedij COI je odkrila jasno dvodelno strukturo drevesa (Slika 13), čeprav ne ena ne druga razvejitev ni najmočnejše statistično podprta (76/78 %). Večjo skupino, poimenovali smo jo klad I, sestavlja večina haplotipov COI (90,5 %) iz vseh petih geografskih območij. Manjša skupina – klad II – je sestavljena iz preostalih 9,5 % haplotipov iz štirih geografskih območij (brez severnega Atlantika).



Slika 13: Mesečinka - filogenetsko drevo rekonstruirano z Bayesovim statističnim pristopom na osnovi nukleotidnih zaporedij COI in evolucijskega modela K81uf+G. Številke na razcepiščih prikazujejo posteriorno verjetnost, skupine z vrednostjo verjetja pod 50% so združene. Oznake haplotiov ustrezajo osebkom v Prilogi A. Geometrijski znaki označujejo geografski izvor haplotipov. Številke ponazarjajo frekvence haplotipov.

Figure 13: Mauve stinger - phylogenetic tree reconstructed with Bayesian inference based on COI sequences under a K81uf+G model of evolution. Numbers at nodes indicate posterior probabilities. Groups with posterior probabilities under 50% are collapsed to form polytomies. Haplotypes are labeled as in Appendix A. Symbols represent the geographic location of haplotypes along with their frequency.



Slika 14: Filogenetski odnosi pri mesečinki rekonstruirani z Bayesovim statističnim pristopom na osnovi nukleotidnega zaporedja ITS in evolucijskega modela K80. Številke na razcepiščih prikazujejo posteriorno verjetnost, skupine z vrednostjo verjetja pod 50% so združene. Oznake haplotipov ustrezajo osebkom v Prilogi A. Geometrijski znaki nakazujejo geografski izvor haplotipov. Številke ponazarjajo frekvence haplotipov.

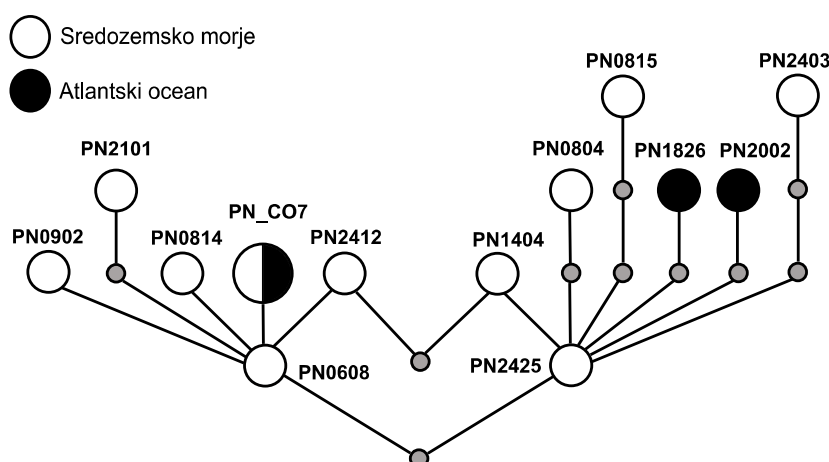
Figure 14: Mauve stinger - phylogenetic tree reconstructed with Bayesian inference based on ITS sequences under a K80 model of evolution. Numbers at nodes indicate posterior probabilities. Groups with posterior probabilities under 50% are collapsed to form polytomies. Haplotypes are labeled as in Appendix A. Symbols represent the geographic location of haplotypes along with their frequency.

Na vsakem geografskem območju smo našli enega ali več haplotipov, ki se pojavljajo še vsaj na enem ali več območjih. To so haplotipi pod oznakami PN_CO1 – PN_CO11. Od tega je šest haplotipov skupnih tako sredozemskim kot atlantskim območjem. Najpogostejši haplotip PN_CO4 je bil odkrit v 28 osebkih in je prisoten v skoraj vseh geografskih območjih (razen severnem Atlantiku). Ostali skupni haplotipi so bistveno manj številčni, najdeni le v štirih do dveh osebkih. Preostalih 93 haplotipov je unikatnih, najdeni so le v enem osebku.

Drevo ITS1-ITS2 (Slika 14) je po strukturi podobno drevesu COI-ITS1-ITS2 (ni prikazano). Obe drevesi se strukturno razlikujeta od drevesa COI, imata namreč neizrazito in slabo pojasnjeno topologijo, brez statistično podprtih razvejitev. Haplotipi se prav tako kot v drevesu COI ne združujejo glede na geografski izvor.

Filogenetske analize mesečink iz evropskih morjih in severozahodnega Atlantika ne podpirajo nobene strukturiranosti na geografsko omejene populacije. Na osnovi teh rezultatov gre sklepati, da je očitno med vsemi proučevanimi območji velik in skoraj neomejen genski pretok.

Mreže haplotipov prav tako ne podpirajo geografske strukturiranosti mesečink, kar je v skladu z vsemi filogenetskimi analizami. Tako mreže haplotipov COI kot ITS ne razjasnijo sorodstvenih odnosov, ker imajo veliko zamreženost, kar predstavlja dvoumne in nerazrešljive sorodstvene odnose in zato niso posebej prikazane. V mrežah haplotipov COI smo ne glede na metodo za izdelavo mrež haplotipov – metoda po kriteriju statistične varčnosti in "median-joining" metoda – opazili isto razdelitev na klad I in klad II. Mreža haplotipov COI iz klada I je zvezdaste oblike (z najpogostejšim haplotipom PN_CO4 je povezana večina haplotipov, ki pa imajo nato še dodatne številne medsebojne povezave). Verjetno veliko število recentnih haplotipov onemogoča jasno rekonstrukcijo zgodovine klada I. Mreža na osnovi haplotipov COI iz klada II kaže bolj nedvoumne in jasne odnose (Slika 15). Večina haplotipov klada II (10) je sredozemskih, dva haplotipa sta atlantska, en haplotip pa je skupen Sredozemlju in Atlantiku. Na bazi mreže sta dva sredozemska haplotipa (PN0608 in PN2425), kar verjetno nakazuje sredozemski izvor haplotipov iz klada II.



Slika 15: "Median-joining" mreža ($\epsilon = 0$) haplotipov COI iz klada II. Velikosti krogov so v sorazmerju s frekvenco haplotipov. Barva krogov označuje geografski izvor haplotipov. Male sive pike simbolizirajo hipotetične predniške haplotipe, ki jih vzorčenje ni zajelo. Oznake haplotipov ustrezajo osebkom v Prilogi A.

Figure 15: Median-joining network ($\epsilon = 0$) for mauve stinger COI haplotypes of Clade II. The sizes of circles are proportional to the haplotype frequencies and the colors of circles indicate the geographic origin. Small grey circles hypothetical ancestral haplotypes, which were not sampled. Haplotypes are labeled as in Appendix A.

V Preglednici 3 so prikazane genetske razdalje med pari geografskih območij mesečink v evropskih morjih. Za regijo COI je bil najprimernejši kriterij za izračunavanje po modelu Tamura in Nei (1993), za regijo ITS pa po Kimurinem dvoparametričnem modelu (Kimura, 1980). V zgornjem desnem kotu so predstavljene razdalje med pari geografskih območij v regijah ITS, v spodnjem levem kotu pa razdalje med pari geografskih območij v regijah COI.

Tako parne Φ_{ST} vrednosti COI kot ITS so pri mesečinkah zelo nizke in statistično neznačilne. Edino statistično podprto genetsko raznolikost smo opazili med haplotipi COI iz severnega in južnega Jadrana ($\Phi_{ST} = 0,095$, $p = 0,01$).

Preglednica 3: Mesečinka - parne Φ_{ST} vrednosti med geografskimi regijami na osnovi 10000 permutacij.

Table 3: Mauve stinger - pairwise Φ_{ST} values between geographic regions based on 10000 permutations.

	severni Jadran	južni Jadran	zahodno Sredozemlje	Azori	severni Atlantik
severni Jadran	-	-0,025	0,004	-0,024	-0,021
južni Jadran	*0,095	-	-0,019	-0,028	-0,029
zahodno Sredozemlje	0,029	-0,004	-	-0,004	-0,006
Azori	0,024	-0,015	-0,025	-	-0,036
severni Atlantik	0,015	0,045	0,017	0,009	-

*statistično značilna razlika ($p < 0,01$); pod diagonalo: Φ_{ST} vrednosti za COI; nad diagonalo: Φ_{ST} vrednosti za ITS

V skladu s parnimi Φ_{ST} vrednostmi so tudi rezultati prostorske analize molekulske variance (SAMOVA). Skoraj vsa genetska raznolikost v mitohondrijskem markerju (95% in več) in 100% jedrne raznolikosti ITS pripada variabilnosti znotraj posameznih geografskih območij. Preostali zanemarljiv delež odpade na variabilnost med alternativnimi skupinami širših geografskih območij (Preglednica 4). Alternativno načrtovanje gnezditve (angl. nesting design), ki smo ga testirali s SAMOVA analizo, ni določilo nobenih statistično podprtih grupiranj geografsko omejenih populacij, raznolikost med območji znotraj širših skupin je v nekaterih primerih celo negativna. Alternativne skupine geografskih območij tudi ne odražajo združevanja na osnovi geografske bližine. Zelo šibka povezanost se kaže med populacijami severnega Jadrana, zahodnega Sredozemlja in severnega Atlantika. Presenetljivo se populacija iz južnega Jadrana ne združuje niti s severnim Jadranom niti zahodnim Sredozemljem.

Preglednica 4: Prostorska analiza molekulske variance (SAMOVA) za $K = 2,3,4$ alternativna grupiranja geografskih območij. Okrajšave geografskih območij: SJ – severni jadransko, JJ – južni Jadran, ZS – zahodno Sredozemlje, AZ – Azori, SAO – severni Atlantski ocean.

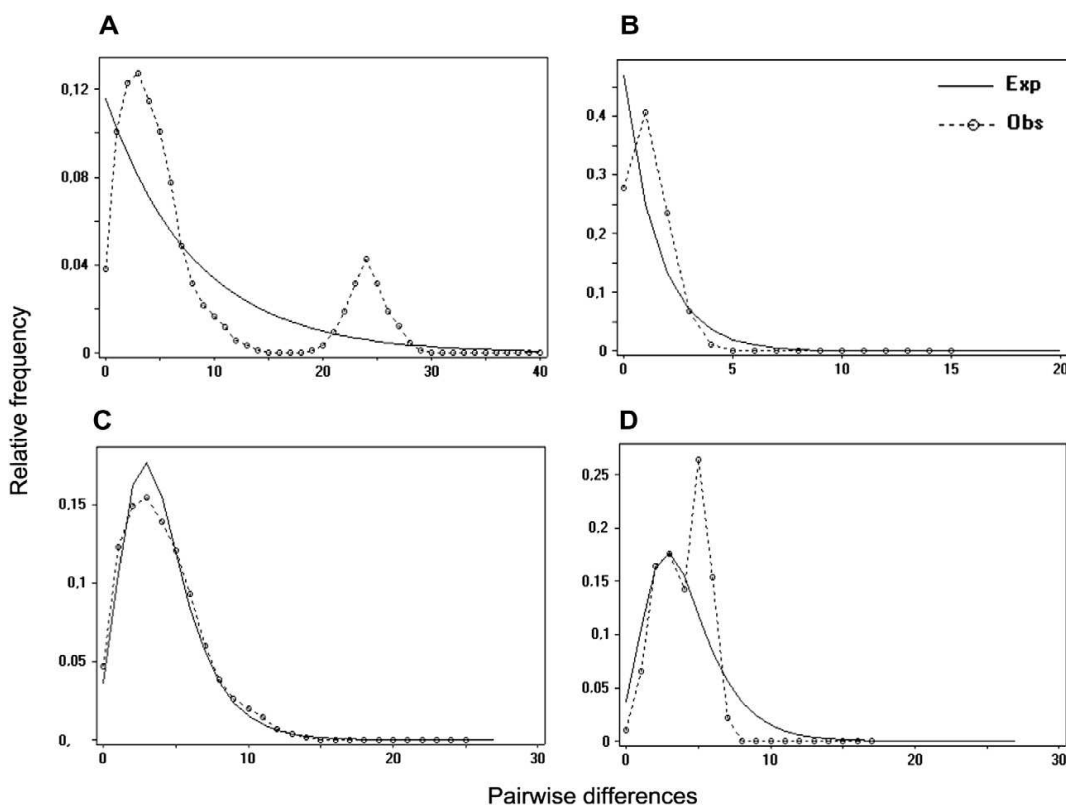
Table 4: Spatial analysis of molecular variance (SAMOVA) for $K = 2,3,4$ alternative groupings of geographic regions. Geographic abbreviations: SJ – north Adriatic, JJ – south Adriatic, ZS – western Mediterranean, AZ – Azores, SAO – north Atlantic Ocean.

Število skupin	Genetski marker	Sestava skupin	Raznolikost med skupinami geografskih območij (%)	Raznolikost znotraj geografskih območij (%)
2	COI	{SAO, ZS, AZ, SJ} {JJ}	3,67	95,7
	ITS	{SAO, ZS, AZ, SJ} {JJ}	-1,35	102,6
3	COI	{SAO, ZS} {AZ, SJ} {JJ}	2,80	97,3
	ITS	{SAO, ZS, AZ} {SJ} {JJ}	-0,67	101,7
4	COI	{SAO, ZS} {AZ} {SJ} {JJ}	0,04	98,0
	ITS	{SAO, ZS} {AZ} {SJ} {JJ}	-1,85	101,7

Pri vseh testih je verjetnost strukture, ki bi imela večjo varianco med skupinami, statistično neznačilna ($p > 0,05$; ocenjene na osnovi 1023 naključnih permutacij).

Izračuni z Mantelovim testom prav tako niso potrdili populacijske strukturiranosti. Korelacija med genetskimi razdaljami (parnimi Φ_{ST} vrednostmi) in geografskimi razdaljami je statistično neznačilna in rahlo negativna ($r_Y = -0,062$, $p = 0,531$). Tako na osnovi filogenetskih analiz, parnih Φ_{ST} vrednosti, SAMOVA rezultatov in stopnji izolacije zaradi oddaljenosti nismo odkrili nobene podpore za strukturiranost na geografsko omejene populacije. Vsi rezultati nakazujejo na veliko mešanje haplotipov tako po Sredozemskem morju kot tudi severnem Atlantiku.

Razporeditev neujemanj haplotipov je eden izmed parametrov, ki pojasnjujejo demografsko preteklost populacij. Na Sliki 16 je predstavljena razporeditev neujemanj haplotipov COI in ITS pri mesečinki. Skupna razporeditev neujemanj haplotipov COI ima dvojno modalnost in odstopa od krivulje razporeditve ob populacijski rasti (Slika 16A). Dva vrhova na krivulji sta posledica dihromnega filogenetskega vzorca v mitohondrijski DNA (Slika 13). Prav tako imajo dvojno modalnost tudi razporeditve neujemanj haplotipov COI iz vseh geografskih območij, saj so haplotipi COI iz obeh filogenetskih kladov razporejeni po vseh geografskih območjih. Ločeni razporeditvi neujemanj za klad I in klad II sta enomodalni (Slika 16C in 16D) in podobni pričakovani krivulji ob hitri populacijski rasti v preteklosti. Verjetno je vsak klad posebej imel obdobje ekspanzije pred ali po tem, ko so haplotipi prišli v sekundarni kontakt. Razporeditve neujemanj haplotipov ITS so enomodalne tako za vsa območja skupaj kot za posamezna geografska območja (Slika 16B).



Slika 16: Mesečinka - razporeditvi neujemanj za celoten set haplotipov COI (A) in ITS (B) ter razporeditvi neujemanj haplotipov COI v kladu I (D) in kladu II (C). Ravna črta prikazuje pričakovano razporeditev, prekinjena črta prikazuje dejansko opaženo razporeditev.

Figure 16: Mauve stinger - mismatch distributions for the total set of sequences: COI (A), ITS (B). COI mismatch distributions for Clade I (D) and Clade II (C). The solid line represents the expected distribution and the dashed line represents the observed distribution.

Za pojasnitev demografske preteklosti mesečink v evropskih morjih smo izračunali še dodatne parametre, ki testirajo teorijo nevtralnosti (Preglednica 5). V kladu I smo opazili nizke in statistično značilne vrednosti $F_u F_s$ (-153,6, $p < 0,01$) in Tajima D (-2,468, $p < 0,01$). Take vrednosti so značilne za populacije, ki so preživele nedavno demografsko ekspanzijo, kar podpira tudi enomodalna razporeditev neujemanj in nizka vrednost statistike R_2 (0,021). Vrednosti vseh treh parametrov za testiranje nevtralnosti v COI in ITS regijah pri združenih sredozemskih in združenih atlantskih vzorcih so podobne (Preglednica 5). Ti rezultati kažejo ali na podoben vzorec demografske preteklosti populacij v Sredozemlju in Atlantiku in/ali recentno mešanje haplotipov med obema območjema.

Preglednica 5: Mesečinka - testi nevtralnosti za nukleotidna zaporedja COI in ITS.

Table 5: Mauve stinger - tests of neutrality for COI and ITS sequences.

	Tajima D	$F_u F_s$	R_2
COI			
Klad I	-2,484***	-153,8**	0,019
Klad II	-1,594	-9,3**	0,069
Sredozemlje	-1,980*	-34,3**	0,037
Atlantik	-1,939*	-28,1**	0,045
Skupaj	-2,103*	-139,4**	0,031
ITS			
Sredozemlje	-1,808*	-11,3**	0,037
Atlantik	-1,838	-9,3**	0,045
Skupaj	-2,044*	-22,0**	0,027

Zvezdice označujejo statistično značilne rezultate: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

V mitohondrijskem fragmentu gena COI v mesečinkah smo ugotovili visoko efektivno število kodonov (ENC). Vrednost ENC od vseh haplotipov je visoka (52,3) in tudi vrednosti ENC med obema filogenetskima kladoma se bistveno ne razlikujeta (50,5 v kladu I in 52,1 v kladu II). Relativno veliko efektivno število kodonov (teoretični minimum je 20 in maksimum je 61) kaže na nizko pristransko uporabo kodonov (angl. codon usage bias) in s tem verjetno na majhno efektivno populacijsko velikost.

4.4 GENETSKA DIFERENCIACIJA V UHATEM KLOBUČNJAKU (*Aurelia aurita*)

V analizo genetske diferenciacije uhatih klobučnjakov v evropskih morjih je bilo vključenih 60 osebkov iz 7 lokacij. Z začetnima oligonukleotidoma AU-LCO in AU-HCO smo uspešno pomnožili in sekvencirali 43 nukleotidnih zaporedij COI dolžine 655 bp, preostala zaporedja smo uporabili iz javne podatkovne zbirke GenBank (Priloga B4). Vsa nukleotidna zaporedja COI so po preverjanju podobnosti nukleotidnih zaporedij z orodjem BLAST bila najbolj podobna regiji COI uhatega klobučnjaka. V teh regijah je bilo določenih 184 variabilnih mest, od tega 173 informativnih po kriteriju varčnosti. Preverjanje pravilnosti nukleotidne poravnave z določanjem aminokislinske identitete po kodu za mtDNA "Coelenterata" je za

vsa zaporedja bilo uspešno, brez stop kodonov. Po usklajevanju nukleotidnih zaporedij je bilo določenih 30 različnih haplotipov (Priloga A), od tega 27 haplotipov, ki so bili najdeni le na enem geografskem območju. Preostali trije haplotipi so bili prisotni na dveh ali treh območjih.

Po preverjanju podobnosti nukleotidnih zaporedij z orodjem BLAST so bila nova nukleotidna zaporedja ITS najbolj podobna regijam ITS uhatega klobučnjaka. V poravnava obih zaporedij ITS smo zasledili veliko nukleotidno variabilnost in dolžinski polimorfizem (Priloga B5 in B6). V regiji ITS1 je bilo pri 44 osebkih določenih 21 različnih haplotipov, v regiji ITS2 pa v 39 osebkih 21 različnih haplotipov. Združeni regiji ITS1-ITS2 sta tvorili 24 privatnih haplotipov različnih dolžin (767 bp - 842 bp) s 205 variabilnimi mesti, od teh 169 informativnih po kriteriju varčnosti.

Preglednica 6: Uhati klobučnjak - raznolikost v nukleotidnih zaporedjih COI in ITS glede na geografska območja.

Table 6: Moon jelly - diversity in COI and ITS sequences according to geographic region.

geografsko območje	število osebkov		število haplotipov*		haplotipska raznolikost		nukleotidna raznolikost	
	COI	ITS	COI	ITS	h		π [%]	
					COI	ITS	COI	ITS
Jadransko morje	13	9	5 (5)	5 (5)	0,756	0,583	0,54	0,63
Mljet	8	6	6 (4)	6 (6)	0,893	1,000	4,55	4,49
**Mljet	7	5	5 (4)	5 (5)	0,857	1,000	0,20	1,16
<i>borealis</i>	39	20	21 (20)	12 (12)	0,862	0,956	1,55	4,84
** <i>borealis</i>	38	17	20 (19)	9 (9)	0,855	0,934	0,68	1,01
Črno morje	21	11	9 (7)	9 (9)	0,653	0,917	2,42	9,63
**Črno morje	20	9	8 (7)	6 (6)	0,490	0,847	0,15	0,29
Baltsko morje	4	3	2 (1)	1 (1)	0,500	0,420	0,78	0
Severno morje	6	5	5 (3)	4 (4)	0,900	0,900	0,85	0,69
SV Atlantik	5	/	4 (4)	/	0,900	/	0,56	/
SZ Atlantik	3	/	3 (3)	/	1,000	/	0,93	/
Skupaj	60	39	30	24	0,921	0,952	9,85	13,44

* v oklepajih je navedeno število privatnih haplotipov

** izračuni parametrov glede na razporeditev haplotipov po kladah na filogenetskih drevesih (glej Slika 17 in Slika 18)

Pod prekinjeno črto v poševnem tisku so izračunani parametri za geografske regije, ki sodijo v klad *borealis*.

Analize molekulske variance (AMOVA) nakazujejo, da je tako v regijah COI kot v regijah ITS večja raznolikost med geografskimi območji (COI: 87,1 % , ITS: 77,9 %). Zelo nizek delež odpade na raznolikost znotraj geografskih območij (COI: 12,9 % , ITS: 22,1 %). Rezultati izračunov genetske raznolikost med sedmimi geografskimi območji v evropskih morjih in zahodnem severnem Atlantiku so prikazani v Preglednici 6. Vse mere genetske raznolikosti (h , π in število privatnih haplotipov) kažejo na večjo raznolikost regij ITS kot regij COI. Skupna haplotipska raznolikost v regijah ITS je 0,952, v regiji COI pa 0,921. Največja haplotipska raznolikost COI je bila najdena na območju severozahodnega Atlantika (1,0), medtem ko je največja haplotipska raznolikost ITS (1,0) odkrita na območju Mljeta. Če upoštevamo razporeditev glede na filogenetske skupine, je največja haplotipska raznolikost ITS in COI najdena v kladu Mljet (1,0 in 0,857). Skupna nukleotidna raznolikost je večja v regijah ITS (13,44 %) kot v regiji COI (9,85 %). Če upoštevamo razporeditev glede na geografska območja, največjo nukleotidno raznolikost ITS zasledimo na območju Črnega morja (9,63 %), največjo nukleotidno raznolikost COI pa na območju Mljeta (4,55 %). Ob

upoštevanju razporeditve glede na filogenetske skupine je največja nukleotidna raznolikost ITS najdena v kladu Mljet (1,16 %), medtem ko je največja nukleotidna raznolikost COI v kladu *borealis* (0,68 %).

Zaradi velike variabilnosti regij ITS uhatih klobučnjakov smo podrobneje pregledali tudi variabilnost znotraj posamezne regije ITS1 in ITS2 (Preglednica 7). Večjo haplotipsko in nukleotidno raznolikost smo zasledili v regiji ITS1. Glede na rezultate haplotipske in nukleotidne raznolikosti v Preglednici 7 ter ločenih filogenetskih dreves za ITS1 (Priloga C2) in ITS2 (ni prikazano) se je izkazalo, da odstopanje med geografsko in filogenetsko razporeditvijo haplotipov nastaja zaradi haplotipov ITS2, medtem ko se pri haplotipih ITS1 geografska in filogenetska razporeditev haplotipov povsem ujemata.

Preglednica 7: Uhati klobučnjak - raznolikost v nukleotidnih zaporedjih ITS1 in ITS2 glede na geografska območja.

Table 7: Moon jelly - genetic diversity in ITS1 and ITS2 sequences according to geographic region.

geografsko območje	število osebkov		število haplotipov*		haplotipska raznolikost h		nukleotidna raznolikost π [%]	
	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2	ITS1	ITS2
Jadransko morje	12	11	6 (6)	5 (5)	0,600	0,491	1,15	0,35
Mljet	7	6	6 (6)	5 (3)	0,806	0,867	0,89	6,11
**Mljet	n.s.	5	n.s.	4 (4)	n.s.	0,800	n.s.	0,56
<i>borealis</i>	25	22	9 (9)	13(11)	0,628	0,848	1,34	6,56
** <i>borealis</i>	n.s.	19	n.s.	10(10)	n.s.	0,824	n.s.	0,47
Skupaj	44	39	21	21	0,908	0,897	14,71	10,65

* v oklepajih je navedeno število privatnih haplotipov

** izračuni parametrov glede na razporeditev haplotipov po kladah na filogenetskih drevesih (glej Priloga C2)

n.s. ni spremembe

Za koreninjenje dreves smo uporabili homologni zaporedji sorodnih taksonov: *Pelagia noctiluca* (Pelagiidae), *Cyanea capillata* (Cyaneidae). Vključujoč zunanje skupine je analiza variabilnih mest COI odkrila 256 variabilnih mest, od tega je 162 mest informativnih po kriteriju varčnosti. Za uhate klobučnjake je v regiji COI značilna nukleotidna sestava z visoko zastopanostjo timina (36,4 %), v primerjavi z adeninom (32,3 %), citozinom (19,1 %) ter zelo nizka zastopanost gvanina (12,2 %). Kljub manjši zastopanosti gvanina pri nekaterih haplotipih razlike v nukleotidni sestavi med haplotipi COI niso statistično značilne ($\chi^2 = 102,22$, s.p. = 417, $P = 1$). Ocenjena vrednost parametra α je bila 1,48 z deležem nespremenljivih mest 0,61. Kot najboljši evlucijski model substitucije je bil določen model HKY+I+G (Hasegawa-Kishino-Yano, 1985). To je šestparametričen model, ki upošteva še delež nevariabilnih mest (Gu in sod., 1995) in različno pogostost substitucij na različnih pozicijah vzdolž zaporedja (Yang, 1994). Pri regijah ITS je vključujoč z zunanjimi skupinami analiza variabilnih pozicij odkrila 243 variabilnih mest, od tega je 153 mest informativnih po kriteriju varčnosti. Značilna nukleotidna sestava regij ITS ima skoraj uravnoteženo zastopanost vseh nukleotidov: timin (28,2 %), adenin (26,7 %), citozin (22,5 %) in gvanin (22,6 %). Nukleotidna sestava med haplotipi ITS je homogena ($\chi^2 = 67,67$, s.p. = 99, $P = 1$). Ocenjena vrednost parametra α je bila 0,51. Za najboljši evlucijski model substitucije je bil določen model TVMef+G, ki upošteva enake frekvence nukleotidov, različne hitrosti

substitucij med posameznimi pozicijami v zaporedju, enak nivo tranzicij in različne nivoje transverzij (Posada in Crandall, 1998).

Filogenetsko analizo uhatega klobučnjaka smo izvedli po Bayesovem pristopu, metodi varčnosti in metodi največjega verjetja za vse štiri kombinacije nukleotidnih zaporedij (COI, ITS1-ITS2, COI-ITS1-ITS2, ITS1). Drevesa po metodi varčnosti in metodi največjega verjetja niso posebej prikazana, ker imajo podobno topologijo in podporo razvejitev kot drevesa po Bayesovem pristopu. V vseh filogenetskih analizah so se tako v regijah COI kot ITS haplotipi iz evropskih morji razporedili v tri dobro (Bayesova posteriorna verjetnost 98 – 100 %) statistično podprte klade: klad Jadransko morje (*Aurelia* sp. 8), klad Mljet (*Aurelia* sp. 5) in klad *borealis* (severni Atlantik, Severno in Baltsko morje, Črno morje). Imena kladov so povzeta po predhodnih raziskavah (Schroth in sod., 2002; Dawson in sod., 2005). Na podlagi razporeditev haplotipov po filogenetskih drevesih se nadalje uporablja skupni izraz *borealis* (Schroth in sod., 2002) za naslednja geografska območja: severni Atlantik, Severno in Baltsko morje, Črno morje.

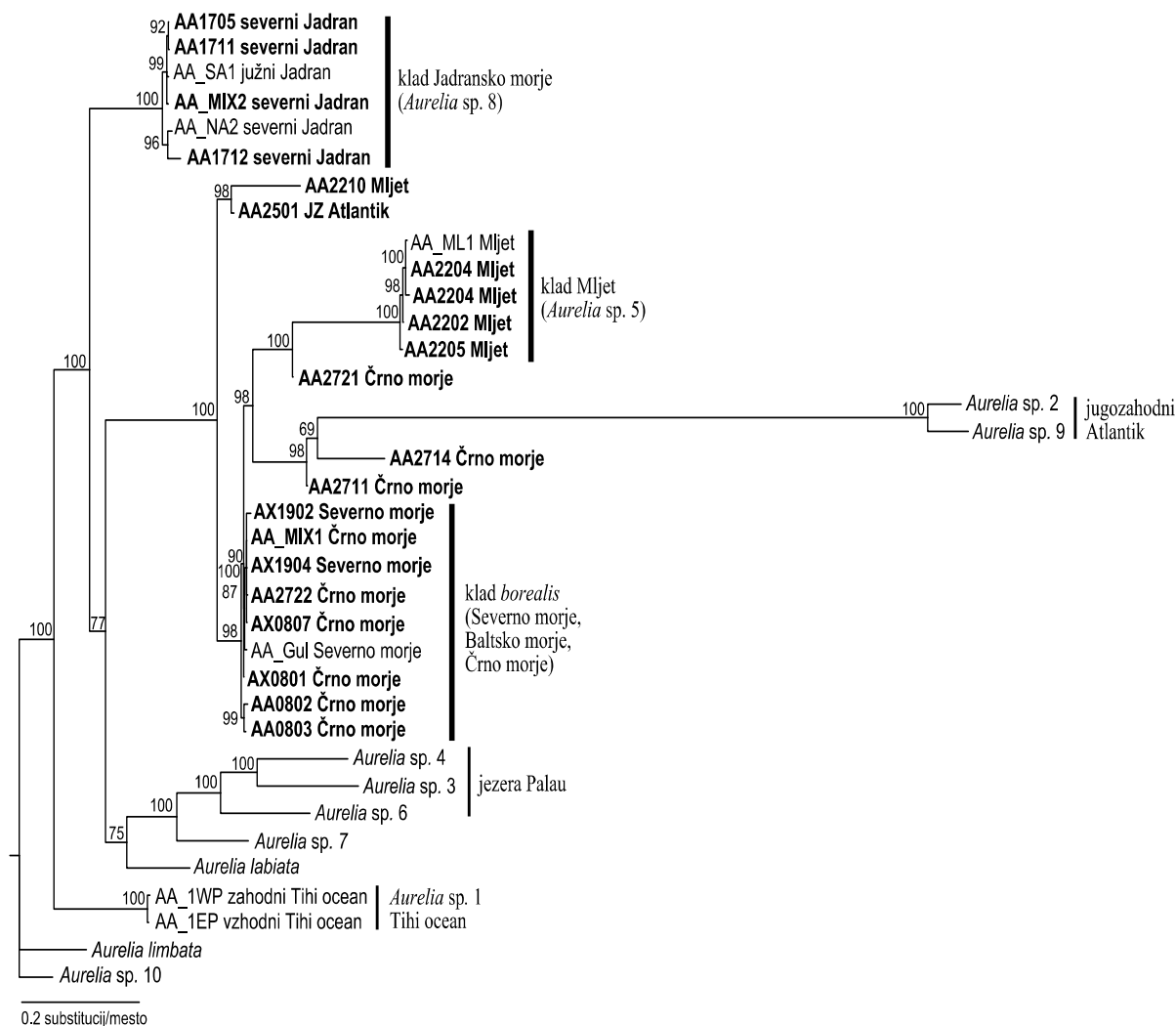
Drevo COI-ITS1-ITS2 (Slika 17) ima podobno topologijo in podporo razvejitev kot drevo ITS1-ITS2 (ni prikazano). Na obeh drevesih je klad haplotipov iz Velikega jezera na otoku Mljet (*Aurelia* sp. 5) sestrski kladu *borealis* ter predstavnikom kriptičnih vrst *Aurelia* sp. 2 in *Aurelia* sp. 9 (Dawson in sod., 2005), medtem ko je klad haplotipov iz Jadranskega morja (*Aurelia* sp. 5) postavljen bazalno glede na oba klada in predstavnike petih kriptičnih vrst (*Aurelia* sp. 3, *Aurelia* sp. 4, *Aurelia* sp. 6, *Aurelia* sp. 7, *Aurelia* sp. 9 in *Aurelia labiata*), ki so jih določili Dawson in sodelavci (2005). Razvejitve so dobro statistično podprte (Bayesova posteriorna verjetnost 75 - 100 %). V drevesu COI (Slika 18) je klad Mljet blizu kladu Jadransko morje, medtem ko je klad *borealis* bližje predstavnikom kriptičnih vrst *Aurelia* sp. 2, *Aurelia* sp. 3, *Aurelia* sp. 4, *Aurelia* sp. 6, *Aurelia* sp. 7, *Aurelia* sp. 9 in *A. labiata*. Nobena od teh dveh razporeditev pa v drevesu COI ni dobro statistično podprta (Bayesova posteriorna verjetnost 50/55 %).

Filogenetska razporeditev haplotipov se skoraj popolnoma ujema z razporeditvijo po geografskih območjih. Izjemi sta le haplotipa AA_CO2 in AA_CO6 na drevesu COI, ki se pojavljata tako na območju Mljeta kot Črnega morja. Druga izjema so trije haplotipi iz Črnega morja (AA2711, AA2714, AA2721) in haplotip AA2210 z Mljeta na drevesu COI-ITS1-ITS2, ki se razporejajo samostojno in ne v sklopu klada *borealis* oz. klada Mljet. Tretja izjema je haplotip AA2501 iz jugozahodnega Atlantika, ki se na drevesu COI razporedi po pričakovanih ob haplotipa *Aurelia* sp. 2 in *Aurelia* sp. 9, ki sta ravno tako iz jugozahodnega Atlantika, medtem ko je na drevesu COI-ITS1-ITS2 haplotip AA2501 iz jugozahodnega Atlantika blizu haplotipa AA2210 z Mljeta.

Filogenija celotnega rodu *Aurelia* je predstavljena v Prilogi C. Na osnovi vseh obstoječih nukleotidnih zaporedij COI je v Prilogi C1 predstavljena novejša rekonstrukcija sorodstvenih odnosov med vsemi štirinajstimi kladi in haplotipom AA2501. V Prilogi C2 je nova dopolnjena rekonstrukcija sorodstvenih odnosov na osnovi nukleotidnega zaporedja ITS1. V drevesu ITS1 je predvsem zanimivo to, da je klad Mljet (*Aurelia* sp. 5) zraven klada *A. labiata*. Razporeditev je 100 % statistično podprta.

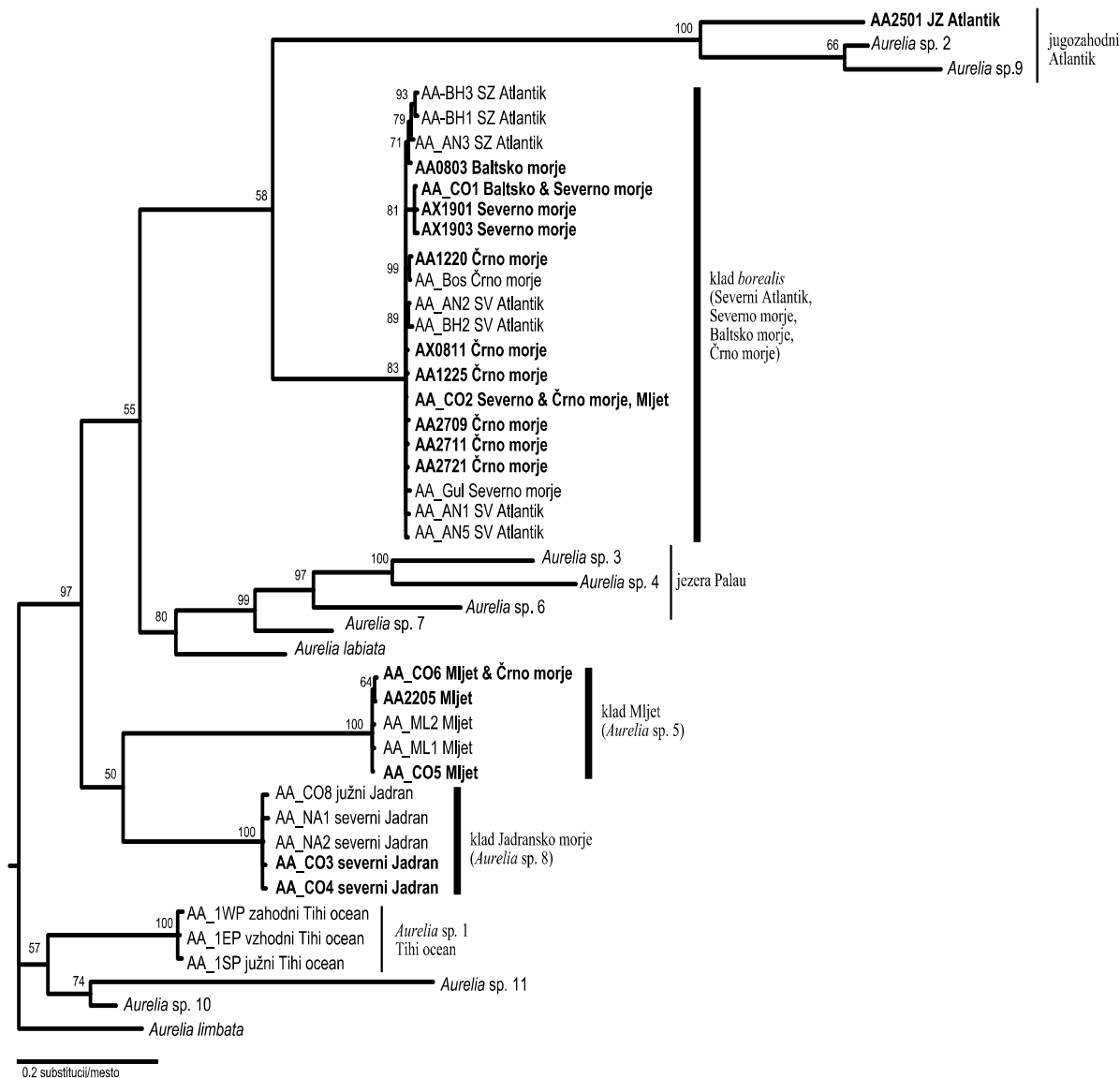
Sorodstvenih odnosi med vzorčevanimi populacijami uhatih klobučnjakov v evropskih morjih in tudi širše v ostalih svetovnih morjih kažejo strukturiranost na geografsko omejene linije, izjema so le posamezni redki haplotipi, ki se pojavljajo na dveh območjih hkrati.

Genski pretok med proučevanimi območji tako verjetno ni povsem onemogočen, ampak je izrazito omejen in izjemen. Nekateri raziskovalci (Dawson in Jacobs, 2001; Dawson in sod., 2005) so zaradi določenega zelo velikega deleža razlik v nukleotidnih zaporedjih COI in ITS (> 10 %, glej še Preglednica 9) filogenetske linije oz. klade uhatih klobučnjakov poimenovali kot kriptične vrste *Aurelia* sp. 1 – *Aurelia* sp. 10.



Slika 17: Uhati klobučnjak – filogenetsko drevo rekonstruirano z Bayesovim statističnim pristopom na osnovi združenih nukleotidnih zaporedij COI-ITS1-ITS2 in evlucijskega modela HKY+I+G (COI) ter TVMef+G (ITS). Številke na razcepisčih prikazujejo posteriorno verjetnost. Oznake haplotiov ustrezajo osebkom v Prilogi A. Poudarjeni haplotipi so novi haplotipi, pridobljeni v okviru te raziskave, ostali haplotipi so vzeti iz javne zbirke GenBank.

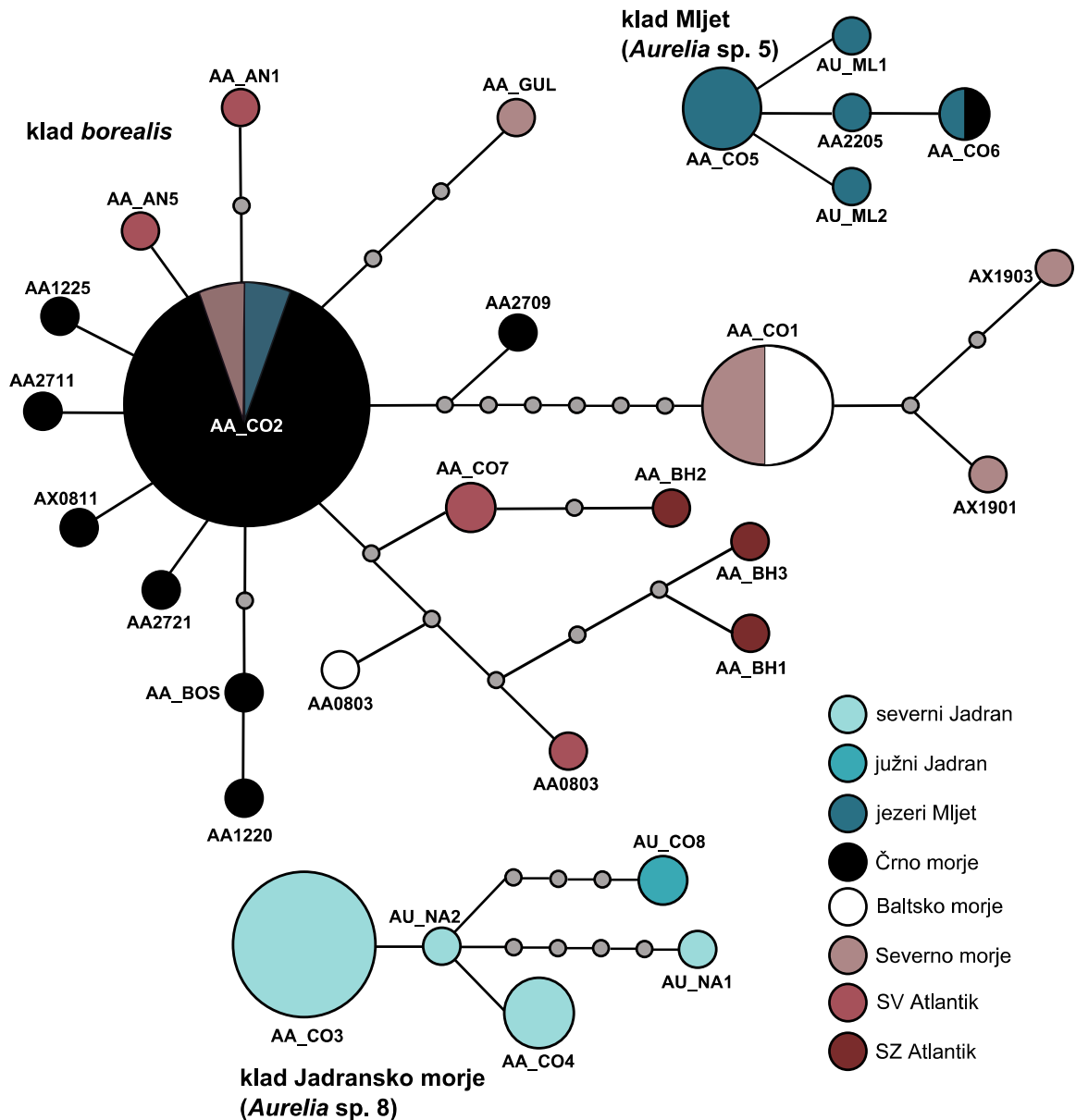
Figure 17: Moon jelly - phylogenetic tree reconstructed with Bayesian inference based on COI-ITS1-ITS2 sequences under a HKY+I+G (COI) and TVMef+G (ITS) model of evolution. Numbers at nodes indicate posterior probabilities. Haplotypes are labeled as in Appendix A. Bolded haplotypes are new haplotypes, retrieved during this study, and the others are from GenBank public database.



Slika 18: Uhati klobučnjak – filogenetsko drevo rekonstruirano z Bayesovim statističnim pristopom na osnovi nukleotidnih zaporedij COI in evolucijskega modela HKY+I+G. Številke na razcepiščih prikazujejo posteriorno verjetnost. Oznake haplotipov ustrezajo osebkom v Prilogi A. Poudarjeni haplotipi so novi haplotipi, pridobljeni v okviru te raziskave, ostali haplotipi so vzeti iz javne zbirke GenBank.

Figure 18: Moon jelly - phylogenetic tree reconstructed with Bayesian inference based on COI sequences and HKY+I+G model of evolution. Numbers at nodes indicate posterior probabilities. Haplotypes are labeled as in Appendix A. Bolded haplotypes are new haplotypes, retrieved during this study, and the others are from GenBank public database.

V skladu s filogenetskimi analizami tudi mreže haplotipov podpirajo geografsko strukturiranosti populacij uhatega klobučnjaka v evropskih morjih. Mreže posameznih filogenetskih skupin na osnovi zaporedij COI in ITS razkrivajo nedvoumne in jasne odnose. Na Sliki 19 so predstavljene mreže haplotipov COI za filogenetske skupine: klad Jadransko morje (*Aurelia* sp. 8), klad Mljet (*Aurelia* sp. 5), klad *borealis*.



Slika 19: Mreža haplotipov COI uhatega klobučnjaka po kriteriju varčnosti. Velikosti krogov so v sorazmerju s frekvenco haplotipov. Obarvanost krogov označuje geografski izvor haplotipov. Vsaka veja v mreži odgovarja eni mutaciji. Male sive pike simbolizirajo hipotetične predniške haplotipe, ki jih vzorčenje ni zajelo. Oznake haplotipov ustrezajo osebkom v Prilogi A.

Figure 19: Parsimony network of COI haplotypes from moon jelly. The sizes of circles are proportional to the haplotype frequencies and the colors of circles indicate the geographic origin. Each branch represents a one mutation. Small circles symbolize hypothetical ancestral haplotypes, which were not sampled. Haplotypes are labeled as in Appendix A.

Genetske razdalje med geografskimi območji in filogenetskimi skupinami v evropskih morjih in severozahodnem Atlantiku so prikazane v Preglednici 8. V zgornjem desnem kotu so predstavljene razdalje med pari geografskih oz. filogenetskih skupin v regijah ITS, v spodnjem levem kotu pa razdalje med pari geografskih oz. filogenetskih skupin v regijah COI. Za regijo COI je bil najprimernejši kriterij za izračunavanje po modelu Tamura in Nei (1993), za regijo ITS pa po Kimurinem dvoparametričnem modelu (Kimura, 1980). Parne genetske razdalje COI in ITS v uhatem klobučnjaku so velike in statistično značilne za geografska območja: Mljet/Jadransko morje, Mljet/Črno morje, Mljet/Severno morje, Mljet/Baltsko morje, Jadransko morje/Črno morje, Jadransko morje/Severno morje, Jadransko morje/Baltsko morje. Ob upoštevanju razporeditev na osnovi filogenetskih dreves, so parne genetske razdalje COI in ITS med vsemi tremi kladi velike in statistično značilne. Po pričakovanjih pa so nizke in statistično neznačilne parne genetske razdalje med vsemi geografskimi območji, ki se uvrščajo v klad *borealis* (Črno morje, Severno in Baltsko morje, severozahodni in severovzhodni Atlantik). Glede na filogenetsko razporeditev skupin je največja parna Φ_{ST} vrednost COI bila določena med kladom Jadransko morje in kladom *borealis* (0,935), največja parna Φ_{ST} vrednost ITS pa med kladom Mljet in kladom *borealis* (0,899).

Preglednica 8: Uhati klobučnjak - parne Φ_{ST} vrednosti med geografskimi območji na osnovi 10000 permutacij.

Table 8: Moon jelly - pairwise Φ_{ST} values between geographic regions based on 10000 permutations.

	Jadransko morje	Mljet	<i>borealis</i>	Črno morje ^B	Baltsko morje ^B	Severno morje ^B	SV Atlantik ^B	SZ Atlantik ^B
Jadransko morje	-	*0,899	*0,802	*0,799	*0,982	*0,977	/	/
Mljet	*0,885	-	*0,696	*0,653	*0,856	*0,861	/	/
<i>borealis</i>	*0,935	*0,865	-	-	-	-	-	-
Črno morje ^B	*0,933	*0,825	-	-	0,029	0,030	/	/
Baltsko morje ^B	*0,976	*0,797	-	-0,169	-	0,444	/	/
Severno morje ^B	*0,948	*0,821	-	0,143	-0,169	-	/	/
SV Atlantik ^B	*0,978	*0,807	-	-0,057	0,461	0,389	-	/
SZ Atlantik ^B	*0,977	*0,766	-	0,029	0,489	0,460	0,172	-

*statistično značilna razlika ($p < 0,01$) na osnovi 10000 permutacij; pod diagonalo: Φ_{ST} vrednosti za COI; nad diagonalo: Φ_{ST} vrednosti za ITS
^B haplotipi iz teh geografskih regij so uvrščeni v klad *borealis*

Nadaljnje testiranje izolacije zaradi oddaljenosti z Mantelovim testom po pričakovanjih na osnovi filogenetskih razporeditev in parnih Φ_{ST} vrednosti ni bilo podprto. Korelacija med genetskimi in geografskimi razdaljami je statistično neznačilna in rahlo negativna ($rY = -0,217$, $p = 0,723$). Bolj v podporo zgoraj omenjenim filogenetskim skupinam (kladom) uhatega klobučnjaka je izolacija glede na najnižjo temperaturo geografskega območja v zimskem obdobju. Mantelov korelacijski koeficient med genetskimi razdaljami in najnižjo zimsko temperaturo na vzorčnem mestu kaže pozitivno in statistično značilno korelacijo ($rY = 0,903$, $p = 0,043$).

Upoštevajoč filogenetsko razdelitev uhatnega klobučnjaka na več linij oz. kladov (t.i. kriptičnih vrst po Dawsonu in sodelavcih, 2005) smo izračunali razlike v nukleotidnih zaporedjih COI in ITS. V Preglednici 9 so podani deleži razlik v nukleotidnih zaporedjih med vsemi linijami v rodu *Aurelia*. Pri zaporedjih COI je dodan še osebek AA2501, ki je bil vzorčevan v južnem Atlantiku na območju argentinskih obalnih voda in se po filogenetskih analizah ne uvršča v nobeno od predhodno poznanih linij uhatnega klobučnjaka. V regiji COI so razlike med linijami v razponu od 14 – 48,5 %, še večji je delež razlik v regijah ITS (11,8 – 59,2 %). Na podlagi razlik v regiji COI izstopa linija *Aurelia* sp. 10, ki se od vseh ostalih razlikuje za 35,5 – 48,5 %. Med vsemi preostalimi linijami (brez *Aurelia* sp. 10) je delež razlik manjši, v razponu od 14,0 – 26,1 %. V povprečju je delež razlik večji v regijah ITS kot v regiji COI. V regijah ITS najbolj izstopata liniji *Aurelia* sp. 2 (49,1 – 57,8 %) in *Aurelia* sp. 9 (49,4 – 59,2 %), ki se sicer občutno razlikujeta od vseh ostalih linij, med seboj pa sta si bolj podobni (14,1 %). Delež razlik med preostalimi enajstimi linijami je manjši (11,8 – 38,9 %).

Preglednica 9: Razlike v nukleotidnih zaporedjih COI in ITS med linijami v rodu *Aurelia*: pod diagonalo % razlik v nukleotidnih zaporedjih COI, nad diagonalo % razlik v nukleotidnih zaporedjih ITS.

Table 9: COI and ITS sequence divergences among lineages in genus *Aurelia*: below diagonal % of COI sequence differences, above diagonal % of ITS sequence differences.

	SP_1	SP_2	SP_3	SP_4	SP_5	SP_6	SP_7	SP_8	SP_9	SP_10	AU BOR	AU LAB	AU LIM
SP_1	-	49,1	27,3	27,9	31,0	26,6	33,1	20,7	49,4	20,8	23,8	32,5	20,2
SP_2	21,0	-	50,2	52,0	50,9	52,0	51,7	49,8	14,1	51,7	49,6	57,8	51,0
SP_3	18,6	22,4	-	23,9	38,2	26,6	33,3	28,8	50,8	30,8	30,5	38,3	30,7
SP_4	18,0	21,8	15,4	-	37,3	26,8	32,8	27,9	51,0	30,7	30,9	36,4	29,8
SP_5	17,4	21,9	16,8	16,9	-	35,3	38,9	25,9	50,8	33,5	26,9	35,3	33,9
SP_6	22,5	24,7	20,4	21,5	22,2	-	31,8	25,8	51,9	24,8	30,2	33,7	26,3
SP_7	17,8	21,2	15,9	15,1	14,0	19,2	-	33,5	50,5	33,1	34,3	35,5	33,2
SP_8	15,6	20,5	18,5	18,6	16,2	22,5	16,5	-	49,8	21,8	19,7	26,5	21,6
SP_9	24,8	16,5	25,9	24,2	24,2	26,1	23,8	24,1	-	50,9	49,7	59,2	51,0
SP_10	39,7	44,9	42,3	43,5	42,9	48,5	42,1	42,3	45,6	-	29,2	30,5	11,8
AU BOR	17,8	21,2	16,3	17,1	17,4	20,4	14,0	18,6	23,5	42,0	-	33,3	29,1
AU LAB	16,2	20,5	15,4	17,3	18,6	16,5	14,7	15,0	22,3	41,7	16,5	-	30,9
AU LIM	19,2	27,7	21,9	21,9	22,8	28,2	22,2	21,5	24,9	35,5	21,3	20,6	-
AA2501	20,0	16,5	20,3	20,6	20,3	18,8	18,5	20,2	19,9	44,3	17,9	19,2	25,8

AU_BOR je okrajšava za linija *borealis*

Demografski izračuni na osnovi geografskih območij in filogenetskih skupin so podani v Preglednici 10. Vse vrednosti upoštevajoč razporeditev na osnovi filogenetskih dreves so statistično neznačilne. Statistično značilne so le vrednosti Tajima D in Fu F_S za COI na

območju Mljet in na geografskih območjih, ki jih uvrščamo v klad *borealis*, če v izračunu upoštevamo izključno geografsko razporeditev haplotipov. Vse preostale vrednosti izračunanih testov nevtralnosti se tako v regijah COI kot v ITS od območja do območja oz. od klada do klada izrazito ne spreminjajo, kar predstavlja podoben vzorec demografske preteklosti teh območij. Razporeditve neujemanj haplotipov kažejo tako v vseh nukleotidnih zaporedjih COI kot ITS enak vzorec večkratne modalne razporeditve. Razporeditve neujemanj haplotipov COI in ITS po posameznih filogenetskih skupinah pa so enomodalne.

Preglednica 10: Uhati klobučnjak - testi nevtralnosti za nukleotidna zaporedja COI in ITS.

Table 10: Moon jelly - tests of neutrality for COI and ITS sequences.

	Tajima's D	Fu's F_S	R_2
COI			
Jadransko morje (<i>Aurelia</i> sp. 8)	-0,428	1,345	0,157
Mljet (<i>Aurelia</i> sp. 5)	-1,884** (-0,876)	3,319** (-2,476)	0,318 (0,137)
<i>borealis</i> (klad <i>borealis</i>)	-2,559*** (-1,571)	-2,532** (-8,149)	0,126 (0,054)
Skupaj	0,982	0,722	0,171
ITS			
Jadransko morje (<i>Aurelia</i> sp. 8)	-1,387	5,063	0,186
Mljet (<i>Aurelia</i> sp. 5)	-1,347 (-0,573)	0,675 (-0,435)	0,300 (0,178)
<i>borealis</i> (klad <i>borealis</i>)	-1,625 (-1,371)	1,583 (-1,207)	0,107 (0,165)
Skupaj	-1,312	0,179	0,096

Zvezdice označujejo statistično značilne rezultate: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

V oklepajih so vrednosti skupin osnovanih na podlagi filogenetskih dreves (Slika 17 in Slika 18).

V mitohondrijskem fragmentu gena COI smo za filogenetske skupine uhatih klobučnjakov določili učinkovito število kodonov (ENC). V uhatih klobučnjakih je celokupno ENC visoko (51,5) in tudi vrednosti ENC znotraj posameznih kladov so visoke (39,6 – 60,1). Relativno veliko učinkovito število kodonov kaže na nizko pristransko uporabo kodonov in s tem verjetno na majhno učinkovito populacijsko velikost.

4.5 GENETSKA DIFERENCIACIJA V VELIKEM KLOBUČNJAKU (*Rhizostoma pulmo*)

Z univerzalnima nevretenčarskima začetnima oligonukleotidoma LCO1490 in HCO2198 (Folmer in sod., 1994) smo uspešno pomnožili in sekvencirali 13 nukleotidnih zaporedij COI enotne dolžine 655 bp (Priloga B7). Vsa nukleotidna zaporedja COI so bila po preverjanju podobnosti nukleotidnih zaporedij z orodjem BLAST podobna regiji COI sorodne vrste *Rhopilema esculentum*. Po usklajevanju nukleotidnih zaporedij smo določili 7 različnih haplotipov COI (Priloga A), vsi haplotipi so privatni. V tej regiji je bilo določenih 9 variabilnih mest, od tega 8 informativnih po kriteriju varčnosti. Preverjanje pravilnosti nukleotidne poravnave z določanjem aminokislinske identitete po kodu za mtDNA od "Coelenterata" je bilo za vsa zaporedja funkcionalno, brez stop kodonov.

Nukleotidna zaporedja ITS so bila po iskanju podobnosti nukleotidnih zaporedij z orodjem BLAST podobna regijam ITS sorodnih vrst *Rhopilema esculentum* in uhatega klobučnjaka. Zaporedji ITS1 in ITS2 se zelo razlikujeta v stopnji variabilnosti. Regija ITS1 je variabilna in ima dolžinski polimorfizem (38 bp dolga delecija na mestih od 151 do 189 in 10 bp dolga insercija na mestih od 288 do 298; Priloga B8), medtem ko je 499bp dolga regija ITS2 povsem nevariabilna (vseh 26 osebkov ima isti haplotip RP2_01; Priloga B9). V regiji ITS1 je bilo pri 24 osebkih določenih 9 različnih haplotipov (Priloga A) s 6 variabilnimi mesti, od teh je eno mesto informativno po kriteriju varčnosti. Sedem haplotipov ITS1 je privatnih, dva haplotipa smo našli na več območjih: haplotip RP1_01 je prisoten v vzorcih iz severnega Jadrana, vzhodnega in zahodnega Sredozemlja, haplotip RP1_02 pa je prisoten v vzorcih severnega Jadrana in južnega Sredozemlja.

Preglednica 11: Veliki klobučnjak - raznolikost v nukleotidnih zaporedjih COI in ITS glede na geografska območja.

Table 11: Barrel jellyfish - diversity in COI and ITS sequences according to geographic regions.

geografska regija	število osebkov		število haplotipov*		haplotipska raznolikost h		nukleotidna raznolikost π [%]	
	COI	ITS	COI	ITS	COI	ITS	COI	ITS
Jadransko morje	8	11	5 (5)	5 (3)	0.893	0.618	0.27	0.14
južno Sredozemlje	5	9	2 (2)	3 (2)	0.600	0.667	0.37	0.03
zahodno Sredozemlje	/	5	/	3 (2)	/	0.800	/	0.52
Skupaj	13	26	7	9	0.910	0.806	0.48	0.18

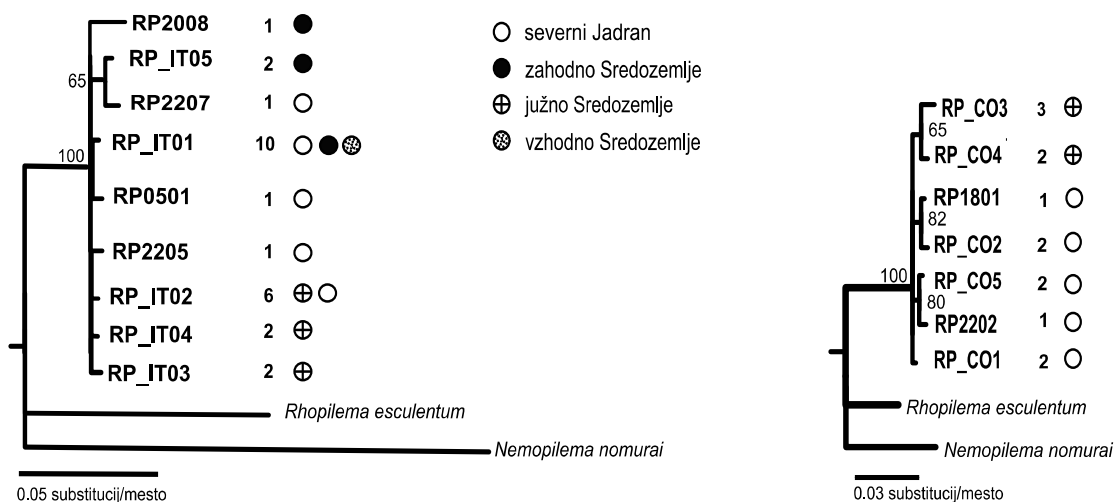
* v oklepajih je navedeno število privatnih haplotipov

Analize AMOVA nakazujejo, da je v regiji COI raznolikost znotraj geografskih območij (53,5 %) približno enaka kot med geografskimi območji (46,5 %), medtem ko je v regijah ITS večja raznolikost znotraj geografskih območij (88,7 %) kot med geografskimi območji (11,3 %). Rezultati izračunov genetske raznolikosti med tremi geografskimi območji v Sredozemskem morju so prikazani v Preglednici 11. Vse mere genetske raznolikosti (h , π in število privatnih haplotipov) kažejo na večjo raznolikost regij COI kot ITS. Skupna haplotipska raznolikost v regiji COI je 0,910, v regijah ITS pa 0,806. Največja haplotipska raznolikost COI je bila najdena v območju severnega Jadrana, medtem ko je bila največja ITS haplotipska raznolikost najdena na območju zahodnega Sredozemlja. Skupna nukleotidna raznolikost je prav tako večja v regiji COI (0,48 %) kot v regiji ITS (0,18%). Največjo nukleotidno raznolikost COI zasledimo na območju južnega Sredozemlja, največjo nukleotidno raznolikost ITS pa na območju zahodnega Sredozemlja.

Za koreninjenje dreves smo uporabili homologno zaporedje sorodnih taksonov: *Rhopilema esculentum* (Rhizostomatidae) in *Nemopilema nomurai* (Rhizostomatidae). Vključujoč zunanje skupine je analiza variabilnih mest COI odkrila 158 variabilnih mest, od tega je 51 mest informativnih po kriteriju varčnosti. Za velikega klobučnjaka je v regiji COI značilna nukleotidna sestava z visoko zastopanostjo timina (36,5 %), v primerjavi z adeninom (25,3 %), citozinom (18,5 %) in gvaninom (19,7 %). Kljub večji zastopanosti timina pri nekaterih haplotipih razlike v nukleotidni sestavi med haplotipi COI niso statistično značilne ($\chi^2 = 0,15$, s.p. = 18, $P = 1$). Ocenjena vrednost parametra α je bila 0,61. Kot najboljši

evolucijski model substitucije je bil določen model K81uf+G, ki upošteva različne frekvence nukleotidov in različno pogostost substitucij na različnih pozicijah vzdolž zaporedja (Kimura, 1981). Pri regiji ITS1 je vključujoč z zunanjimi skupinami analiza variabilnih pozicij odkrila 161 variabilnih mest, od tega je 32 mest informativnih po kriteriju varčnosti. Značilna nukleotidna sestava regije ITS1 ima skoraj uravnoveženo zastopanost vseh nukleotidov: timin (30.1 %), adenin (22,4 %), citozin (23,1 %) in gvanin (24,4 %). Nukleotidna sestava med haplotipi ITS1 je homogena ($\chi^2 = 0,80$, s.p. = 24, P = 1). Za najboljši evolucijski model substitucije je bil določen model K80 (Kimura, 1980).

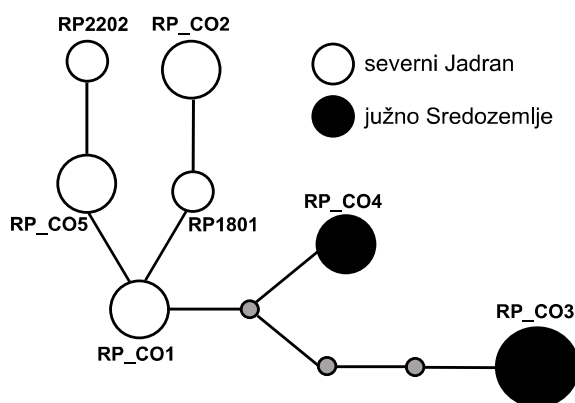
Vsa filogenetska drevesa velikih klobučnjakov imajo ne glede na metodo izračunavanja dreves (Bayesov pristop, metoda varčnosti, metoda največjega verjetja) in vrste nukleotidnega zaporedja (COI, ITS, COI-ITS) podobno osnovno topologijo, brez značilnih razvejitev (Slika 20). Drevesa po metodi varčnosti in metodi največjega verjetja zato niso posebej prikazana. Rekonstrukcije sorodstvenih odnosov med velikimi klobučnjaki na območju Sredozemskega morja ne kažejo strukturiranost na geografsko omejene populacije, ampak nakazujejo genski pretok med proučevanimi območji (skupni haplotipi med več območji).



Slika 20: Veliki klobučnjak – filogenetski drevesi rekonstruirani z Bayesovim statističnim pristopom na osnovi: levo nukleotidnih zaporedij ITS (evolucijski model K80), desno nukleotidnih zaporedij COI (evolucijski model K81uf+G). Številke na razcepiščih prikazujejo posteriorno verjetnost, skupine z vrednostjo posteriornih verjetnosti pod 50% so združene. Oznake haplotipov ustrezajo osebkom v Prilogi A. Geometrijski znaki nakazujejo geografski izvor haplotipov. Številke ponazarjajo frekvence haplotipov.

Figure 20: Phylogenetic relationships within barrel jellyfish derived by Bayesian inference: left ITS sequences (K80 model of evolution), right COI sequences (K81uf+G model of evolution). Numbers at nodes indicate posterior probabilities. Groups with posterior probabilities under 50% are collapsed to form polytomies. Haplotypes are labeled as in Appendix A. Symbols represent the geographic location of haplotypes along with their frequency.

V skladu s filogenetskimi analizami tudi mreže haplotipov ne podpirajo izrazite geografske strukturiranosti velikih klobučnjakov. Mreža na osnovi zaporedij ITS je pokazala veliko zamreženost, kar predstavlja dvoumne in nerazrešljive sorodstvene odnose, zato ni prikazana. Mreža na osnovi zaporedij COI kaže bolj nedvoumne in jasne odnose, ki nakazujejo na večjo sorodnost haplotipov iz severnega Jadrana in večjo raznolikost med haplotipoma iz južnega Sredozemlja (Slika 21).



Slika 21: Mreža haplotipov COI velikega klobučnjaka po kriteriju varčnosti. Velikosti krogov so v sorazmerju s frekvenco haplotipov. Obarvanost krogov označuje geografski izvor haplotipov. Vsaka veja v mreži odgovarja eni nukleotidni mutaciji. Male sive pike simbolizirajo hipotetične predniške haplotipe, ki jih vzorčenje ni zajelo. Oznake haplotipov ustrezajo osebkom v Prilogi A.

Figure 21: Parsimony network of COI haplotypes from barrel jellyfish. The sizes of circles are proportional to the haplotype frequencies and the colors of circles indicate the geographic origin. Each branch represents a one nucleotide mutation. Small circles symbolize hypothetical ancestral haplotypes, which were not sampled. Haplotypes are labeled as in Appendix A.

V Preglednici 12 so prikazane genetske razdalje med pari geografskih območji v Sredozemskem morju. V zgornjem desnem kotu so predstavljene razdalje med pari geografskih skupin v regijah ITS, v spodnjem levem kotu pa razdalje med pari geografskih skupin v regijah COI. Za vsako nukleotidno regijo smo parne Φ_{ST} vrednosti izračunali po najprimernejšem modelu: za regijo COI po modelu Tamura in Nei (1993), za regijo ITS pa po Kimurinem dvoparametričnem modelu (Kimura, 1980). Med območjema Jadransko morje in južno Sredozemlje je velika genetska razdalja COI (0,534) in je statistično značilna. Statistično značilna je tudi genetska razdalja ITS med južnim in zahodnim Sredozemljem (0,303). Genetske razdalje med preostalimi območji so manjše in statistično neznačilne, kar podpira zgoraj navedene rezultate iz filogenetskih analiz in mrež haplotipov.

Preglednica 12: Veliki klobučnjak - parne Φ_{ST} vrednosti med geografskimi območji na osnovi 10000 permutacij.

Table 12: Barrel jellyfish - pairwise Φ_{ST} values between geographic regions based on 10000 permutations.

	Jadransko morje	južno Sredozemlje	zahodno Sredozemlje
Jadransko morje	-	0,048	0,032
južno Sredozemlje	*0,534	-	*0,303
zahodno Sredozemlje	/	/	-

*statistično značilna razlika ($p < 0,01$); pod diagonalo: Φ_{ST} vrednosti za COI; nad diagonalo: Φ_{ST} vrednosti za ITS

Demografski izračuni glede na proučevana geografska območja so podani v Preglednici 13. Vse vrednosti razen celokupna vrednost $F_u F_s$ za ITS (-0,718) so statistično neznačilne. Vrednosti se, ne glede katero nukleotidno regijo izberemo, od območja do območja izrazito ne spreminjajo, kar lahko predstavlja ali podoben vzorec demografske preteklosti teh območij ali recentno mešanje haplotipov med vsemi območji. Tudi razporeditev neujemanj haplotipov kaže tako v regijah COI kot v regijah ITS enak vzorec enomodalne razporeditve.

Preglednica 13: Veliki klobučnjak - testi nevtralnosti za nukleotidna zaporedja COI in ITS.

Table 13: Barrel jellyfish - tests of neutrality for COI and ITS sequences.

	Tajima D	$F_u F_s$	R_2
COI			
Severni Jadran	0,586	-1,449	0,205
južno Sredozemlje	1,641	3,022	0,300
Skupaj	0,344	-0,969	0,169
ITS			
Severni Jadran	-0,778	-0,659	0,165
južno Sredozemlje	1,754	2,302	0,278
zahodno Sredozemlje	-0,562	0,804	0,326
Skupaj	-1,726	-0,718*	0,133

Zvezdice označujejo statistično značilne rezultate: * $p < 0,05$

V mitohondrijskem fragmentu gena COI velikega klobučnjaka smo za obe geografski območji v Sredozemskem morju določili visoko učinkovito število kodonov (ENC). Celokupno ENC je visoko (59,3) in tudi vrednosti ENC znotraj posameznih območij so visoke (60,6 v severnem Jadranu in 57,2 v južnem Sredozemlju). Relativno veliko učinkovito število kodonov kaže na nizko pristransko uporabo kodonov in s tem verjetno majhno učinkovito populacijsko velikost.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 PRIMERJAVA GENETSKE DIFERENCIACIJE V HOLOPLANKTONSKIH IN MEROPLANKTONSKIH KLOBUČNJAŠKIH MEDUZAH

V analizah z dvema neodvisnima genetskima markerjema, mitohondrijskim fragmentom COI in jedrnim fragmentom ITS1/ITS2, smo v evropskih morjih odkrili različne vzorce genetske strukturiranosti populacij v izbranih taksonih klobučnjaških meduz. Filogeografske analize v holoplanktonskih mesečinkah niso pokazale nobene močno podprte genetske in geografske strukture populacij v Sredozemskem morju in severnem Atlantskem oceanu. S tem smo razrešili dvoumnosti, ki so nastale v tradicionalni taksonomski ureditvi (Mayer, 1910; Kramp, 1961), in dokazali, da je v evropskih morjih in severozahodnem Atlantiku prisotna le ena vrsta mesečink - *Pelagia noctiluca*. Veliko mešanje haplotipov mesečink kaže na velik genski pretok med vsemi geografskimi območji. Tako Gibraltarska ožina kot Otrantska vrata za populacije mesečink ne predstavljajo nepremostljive geografske pregrade za genski pretok. Pri meroplanktonskih uhatih klobučnjakov so filogeografske analize na vzorcih iz severnega Atlantskega oceana, Severnega in Baltskega morja, Sredozemskega in Črnega morja pokazale večjo genetsko strukturiranost glede na geografska območja. Tako mitohondrijski kot jedrni podatki podpirajo enake filogeografske skupine, čeprav ostajajo odnosi med njimi nerazrešeni. Genetska diferenciacija med kladi uhatih klobučnjakov v evropskih morjih in severozahodnem Atlantiku je tako velika, da bi si lahko zaslužili obravnavo kot ločene vrste. Če povzamemo naše rezultate in rezultate filogeografskih študij ostalih raziskovalcev, ki so proučevali uhate klobučnjake, vidimo, da so v evropskih morjih prisotne vsaj štiri različne in geografsko dobro opredeljene linije/kriptične vrste uhatih klobučnjakov: klad *borealis*, klad UBI (*Aurelia* sp. 1), klad Mljet (*Aurelia* sp. 5), klad Jadransko morje (*Aurelia* sp. 8). Na osnovi filogeografskih analiz tako lahko ugotovimo, da za uhate klobučnjake Otrantska vrata, Sueški prekop in pas ožin med Severnim in Baltskim morjem ne predstavljajo geografske in ekološke pregrade za genski pretok. Pri meroplanktonskih velikih klobučnjakovih filogeografske analize na vzorcih iz Sredozemskega morja niso pokazale tako očitne genetske strukturiranosti glede na geografske regije kot pri uhatem klobučnjaku, slabo podprto strukturiranost populacij smo zasledili v analizah regij COI. Za velike klobučnjake visoka slanost v španski laguni Mar Menor očitno ni nepremostljiva ekološka pregrada za genski pretok, saj se populacija v laguni Mar Menor ne razlikuje od ostalih populacij v Sredozemskem morju. Odsotnost globokih cepitev, močno podprtih in genetsko zelo raznolikih kladov v filogeografskih analizah velikih klobučnjakov potrjuje skladnost s tradicionalno taksonomsko ureditvijo (Mayer, 1910; Kramp, 1961; Russel, 1970), da je v Sredozemskem morju prisotna le ena vrsta velikih klobučnjakov - *Rhizostoma pulmo*.

Mitohondrijsko (COI) in jedrni (ITS1 in ITS2) nukleotidni zaporedji so lahko primerni polimorfni genetski markerji za filogeografske analize klobučnjakov. Z grafičnim prikazom razmerja med substitucijami in s testom Iss smo namreč dokazali, da nukleotidna zaporedja niso nasičena s substitucijami. Izjema so le regije ITS v uhatih klobučnjakovih, ki po rezultatih testa Iss niso najbolj primerne za filogenetske analize. Primerjava nukleotidnih zaporedij COI pri vseh treh proučevanih vrstah ni pokazala vrzeli in polimorfizma dolžin (655 bp). Nasprotno pa je bila višja variabilnost dolžin med vrstami najdena v regijah ITS1 in ITS2 operonov rRNA. Najdaljše regije ITS z visoko stopnjo dolžinskega polimorfizma so v

meroplanktonskih uhatih in velikih klobučnjakih (767-843 bp), medtem ko imajo holoplanktonske mesečinke očitno krajše regije ITS brez polimorfizma dolžin (645 bp). Tako nizke genetske divergence regij ITS in popolno odsotnost dolžinskega polimorfizma nismo opazili pri nobeni do sedaj proučevani meroplanktonski vrsti klobučnjakov (Dawson, 2005 a - e; Dawson in sod., 2005), zasledili so jo le pri rebračah v rodu *Beroe* (Bayha in sod., 2004), ki so po načinu življenja prav tako holoplanktonski organizmi. Poleg tega imajo mesečinke višjo haplotipsko raznolikost COI kot meroplanktonski uhati in veliki klobučnjaki ($0,958 > 0,919 > 0,910$). Ravno obratno pa je v regijah ITS, kjer imajo višjo haplotipsko raznolikost meroplanktonski uhati in veliki klobučnjaki kot holoplanktonske mesečinke ($0,952 > 0,806 > 0,723$). Nižja genetska raznolikosti fragmentov ITS in COI pri velikem klobučnjaku bi lahko bila artefakt zaradi manjšega števila zaporedij uporabljenih pri analizi. Presenetljivo regija ITS2 velikega klobučnjaka sploh ni variabilna, vsi osebki imajo isti haplotip. Uniformnost regije ITS2 je očitno posebnost predstavnikov družine Rhizostomatidae, saj pri drugih družinah klobučnjakov take uniformnosti regije nismo zasledili. Pri mesečinki smo sicer v regijah ITS1 in ITS2 tudi zasledili veliko uniformnost regij, ki se kaže v nizki haplotipski in nukleotidni variabilnosti regij ITS, vendar ne tako očitno kot v regiji ITS2 velikega klobučnjaka. Verjetno taka homogenizacija nukleotidnih zaporedij nastane zaradi procesa usklajene evolucije, ki je dobro poznan molekularni mehanizem in lahko poteka zelo hitro (Elder in Turner, 1995). Iz primerjave regij ITS klobučnjakov lahko povzamemo, da so v meroplanktonskih vrstah (uhati in veliki klobučnjak) regije ITS1 bolj variabilne kot ITS2, medtem ko so v holoplanktonski vrsti (mesečinka) bolj variabilne regije ITS2 kot ITS1.

5.1.1 Genetska diferenciacija v holoplanktonskih klobučnjaških meduzah

V holoplanktonskih mesečinkah iz različnih lokacij v Sredozemskem morju in severnem Atlantiku smo na osnovi filogeografskih analiz odkrili eno genetsko zelo enotno populacijo. Rezultati vseh analiz močno podpirajo izmenjavo haplotipov mesečink med Sredozemljem in severnim Atlantikom. Tako homogen filogeografski vzorec brez geografsko dobro opredeljenih filogeografskih skupin je verjetno posledica velikega potenciala širjenja, ki ga ima mesečinka kot holoplanktonska vrsta. Učinkovito razširjanje na daljše razdalje omogoča dobro mešanje populacij in velik genski pretok kljub naravnim pregradam, kot so Otrantska vrata, Siciljski prag in Gibraltarska ožina (Patarnello in sod., 2007). Številne morske pelaške vrste z velikim potencialom širjenja imajo podoben vzorec nizke genetske diferenciacije na veliki prostorski skali kljub potencialnim geografskim pregradam za genski pretok (Patarnello in sod., 2007; Luttkhuizen in sod., 2008), kar podpira zanesljivost takega filogeografskega migracijskega modela. Po drugi strani so raziskovalci na območju evropskih morij pri mnogih pelaških morskih vrstah dokazali ravno nasprotno, veliko genetsko strukturiranost populacij in zaznali pregrade za genski pretok, ki so v skladu z razdelitvijo geografskih regij (Borsa in sod., 1997; Peijnenburg in sod., 2004; Dawson in sod., 2005; Debes in sod., 2008).

Velik potencial širjenja in okoljski dejavniki verjetno odločujoče vplivajo na tako uniformen genetski vzorec mesečink v Sredozemlju in severnem Atlantiku. Spremembe v hidrografskem režimu povezane s klimatskimi spremembami ugodno vplivajo na boljše preživetje meduznih larv in populacijsko rast želatinoznega planktona vključujoč larve in meduze mesečink (Molinero, 2008; Licandro in sod., 2010). Neethling in sod. (2008) so potrdili, da življenjske strategije vrste značilno vplivajo na filogeografijo morskih vrst in da potencialne oceanografske ovire vedno ne zavirajo učinkovitega širjenja. Dokončni sklep o

najbolj odločujočem dejavniku je težko podati, kljub temu da so Patarnello in sodelavci (2007) natančno preučili sredozemsko-atlantsko prehodno območje oz. vlogo Gibraltarske ožine kot pregrade za genski pretok na primeru 70 objavljenih raziskav. Odkrili so namreč nasprotujoča si dejstva, kar nakazuje, da filogeografski vzorci niso samoumevno odvisni od življenjske strategije, reprodukcije, ekološke niše ali drugih bioloških dejavnikov. Ta dejstva so Patarnello in sodelavci (2007) vodila do zaključka, da biološke značilnosti vrste ne igrajo samoumevno tako odločujoče vloge na strukturiranje populacij, kot so v preteklosti trdili številni raziskovalci.

Ekološke in biološke lastnosti mesečink npr. oportunistično hranjenje s skoraj vsemi zooplanktonskimi skupinami, tudi z jajci in larvami nektona (Zavodnik, 1991; Malej in sod., 1993; Sabatés in sod., 2010), dolgo razmnoževalno obdobje s holoplanktonskim življenjskim ciklom (Rottini Sandrini in sod., 1984), širok razpon vertikalne migracije (Franqueville, 1970) in sposobnost preživetja v zelo raznolikih ekoloških pogojih (UNEP, 1991) so dejavniki, ki ugodno vplivajo na širjenje osebkov in velik genski pretok. Nasprotno pa so naše filogeografske analize in tudi analize drugih raziskovalcev (Dawson in Jacobs, 2001; Schroth in sod., 2002; Dawson in sod., 2005; Ki in sod., 2008) pri uhatem klobučnjaku in še na nekaterih drugih meroplanktonskih vrstah klobučnjakov (Preglednica 1) pokazale bolj geografsko strukturirane genetske linije. Filogeografski vzorci z različnimi in geografsko dobro opredeljenimi filogeografskimi skupinami so verjetno nastali kot posledica meroplanktonskega življenjskega cikla, predvsem zaradi pritrjene polipne generacije. Schroth in sodelavci (2002) so v raziskavi na uhatih klobučnjakih namreč opazili, da ekološke adaptacije polipov (frekvenca strobilacije in optimalna temperatura za pričetek strobilacije) sovpadajo s klimatskimi in genetskimi diferenciacijami. Tako je verjetno, da ima mesečinka kot holoplanktonska vrsta brez pritrjene polipne generacije sposobnost za kolonizacijo več morskih ekosistemov, kar vodi v povečano homogenizacijo genskih skladov v primerjavi s preostalimi meroplanktonskimi klobučnjaki. Vzorec skoraj popolne panmiksije namreč ni bil ugotovljen v nobeni meroplanktonski vrsti klobučnjaških meduz, ampak so bile odkrite bolj geografsko opredeljene genetske strukture pri večini vrst celo z znaki nove speciacije (Dawson in Jacobs, 2001; Schroth in sod., 2002; Holland in sod., 2004; Dawson in sod., 2005; Dawson, 2005 a-e).

Filogeografske analize zaporedij COI mesečink so odkrile dva klada, ki oba vsebujeta haplotipe iz več različnih geografskih območij, kar kaže, da recentne oceanografske lastnosti omogočajo dobro mešanje haplotipov in velik genski pretok med območji Sredozemskega morja in severnega Atlantika. Filogenetska cepitev na dva klada je verjetno nastala na osnovi različnih prelomnih dogodkov v geološki zgodovini Sredozemskega morja, verjetno med obdobji poledenitev v pleistocenu (Thiede, 1978). Za natančnejšo umestitev časa cepitve obeh kladov bi potrebovali dobro umerjeno molekularno uro, ki pa za klobučnjake ni določena (Holland in sod., 2004). Določevanje časa cepitve je pri klobučnjakih nezanesljivo zaradi pomanjkanja fosilnih dokazov, ki jih potrebujemo za pravilno umerjanje molekularne ure (Waggoner in Collins, 2004). Hitrost substitucij tako ni jasno določena. Najprej so trdili, da imajo vsi ožigalkarji nižjo stopnjo mitohondrijske raznolikosti kot višji metazoji (Shearer in sod., 2002). Najnovejše analize (Huang in sod., 2008) nakazujejo, da je verjetno počasna evolucija mitohondrijskih zaporedij značilna le za spužve in koralnjake, medtem ko naj bi imeli predstavniki Medusozoa podobno evolucijsko hitrost mitohondrijskih zaporedij kot višji metazoji. Zaradi omenjenih omejitev čas cepitve mesečink na dva mitohondrijska klada ostaja nepojasnen. Med Atlantikom in Sredozemljem so tekom geološke preteklosti bila številna obdobja prekinitvev in ponovnih povezav. Zagotovo je bila izolacija največja v času

Mesinske krize pred 5,5 milijoni let (Krijgsman in sod., 1999). Na genetsko strukturo večine danes živečih vrst na kopnem in v morju so predvsem vplivala obdobja ledenih dob v pleistocenu (Hewitt, 2000). Serije habitatnih pleistocenskih fragmentacij so v evoluciji številnih vrst predstavljale obdobja s spremenjenim in izredno omejenim genskim pretokom med Sredozemljem in Atlantikom (Bargelloni in sod., 2003 in 2005). Verjetno so isti dejavniki takrat sprožili tudi sortiranje mitohondrijskih linij pri mesečinkah v prednike večjega klada (I), verjetno atlantskega izvora, in manjšega klada (II), verjetno sredozemskega izvora. Po zadnji ledeni dobi so se povezave zaradi spremenjenih klimatskih pogojev med sredozemskim in atlantskim bazenom verjetno spremenile, kar je lahko vplivalo na novo shemo tokovanja, ki je atlantskim in sredozemskim populacijam ponovno omogočila učinkovito mešanje. Sodobna hidrografija Sredozemskega morja (Millot in Taupier-Letage, 2005; Demirov in Pinardi, 2002; Manca in sod., 2003; Gačić in sod., 2010) in Atlantskega oceana (Reid, 1994; Pingree, 2002) kaže na tokovanje, ki omogoča mešanje populacij mesečink med Sredozemskim morjem in Atlantskim oceanom. Tako predpostavljen potek sortiranja linij lahko pojasni tudi nizko pristransko uporabo kodonov in s tem verjetno majhno efektivno velikost populacij v preteklosti. Prav tako s takim preteklim scenarijem pojasnimo statistično značilne negativne vrednosti Tajima D in F_s , ki v obeh kladih kažejo na populacijsko ekspanzijo. Nenadno populacijsko ekspanzijo v obeh kladih potrjujejo tudi posamezne enomodalne razporeditve neujemanj haplotipov.

Pri mesečinki smo odkrili veliko število zelo sorodnih haplotipov COI z majhno frekvenco pojavljanja. Visoka znotrajvrstna haplotipska raznolikost COI pri mesečinki (0,96) je primerljiva z vrednostmi pri drugih klobučnjaških meduzah npr. 1.0 pri vrsti *Catostylus mosaicus* (Dawson, 2005d). Zelo visok delež privatnih COI haplotipov (73,2 %) pa ni bil odkrit pri nobenih drugih klobučnjakih. So pa podoben vzorec raznolikosti COI zasledili pri sardinah (*Sardinops spp.*), ki so bile izpostavljene ekstremnim populacijskim nihanjem in so kazale še večji delež privatnih haplotipov (96,3 %) (Bowen in Grant, 1997). Takim populacijskim fluktuacijam pa so periodično izpostavljene tudi mesečinke, ko izmenjujejo obdobja množičnega pojavljanja z obdobji nizke abundance (Goy in sod., 1989; Kogovšek in sod., 2010). Raziskovalci namreč trdijo, da se vzorec velikega števila nizkofrekvenčnih alelov in zelo sorodnih haplotipov verjetno ustvarja predvsem v vrstah, ki so v svoji evoluciji preživele obdobja večkratnih spreminjanj populacijske velikosti (Maruyama in Fuerst, 1984; Rogers in Harpending, 1992).

Kljub zelo veliki homogenizaciji genskih skladov mesečink v Sredozemlju in Atlantiku, ki jo podpirajo prav vse analize, pa vseeno izstopa izračun genetskih razdalj med severnim in južnim Jadranom, ki je edina statistično značilna vrednost med vsemi rezultati. Statistično značilna genetska razdalja je bila odkrita ravno med najmanj oddaljenima območjema, ki mejita drug na drugega. Glede na rezultate iz oceanografskega modela transporta mesečinke (Malačič in sod., 2007) smo v Jadranskem morju pričakovali najbolj homogeno genetsko strukturo mesečink, saj je iz njihovega modela razvidno, da tokovi omogočajo genski pretok med jadranskimi in tudi ostalimi sredozemskimi populacijami mesečink. Tako se zdi še najbolj verjetno, da bi raznolikost bila posledica ekoloških dejavnikov. Avtorji analize 200 letnega pojavljanja mesečinke v Sredozemskem morju sklepajo, da se mesečinke v Sredozemlju stalno vzdržujejo le v nekaj izvornih območjih (angl. source regions), ob občasnih hidro-klimatskih dejavnikih so pogoji dovolj ugodni, da se lahko populacije namnožijo in jih tokovi naplavijo v bolj produktivna obalna območja (Kogovšek in sod., 2010). Velika produktivnost lokalnih obalnih habitatov (D'Ortezio in Ribera d'Alcalá, 2009) omogoča pospešeno rast in povečano reprodukcijo mesečink (Larson, 1987; Rottini Sandrini

in Avian, 1991), kar se odraža kot lokalno množično pojavljanje mesečink. V Jadranskem morju so na osnovi terenskih opazovanj in rezultatov modeliranja sklepali, da se velikost takih lokalnih množičnih populacij mesečink v enem letu prepolovi in populacija ne more obstati brez dotoka novih osebkov z vodnimi masami iz Sredozemskega morja (Malej in Malej, 2004), zato se zdi severni Jadran kot območje ponora (angl. sink area) (Kawecki, 2004). Vsi osebki za genetske analize sicer niso bili nabrani v istem letu, vendar predpostavljamo, da so bili del istega večletnega množičnega pojava (Goy in sod., 1989; Kogovšek in sod., 2010). V območju južnega Jadrana je bila odkrita največja nukleotidna raznolikost COI. Tako visoka raznolikost mesečink iz južnega Jadrana bi mogoče lahko bila posledica: (i) zelo specifičnih lokalnih tokov in različnega vzorca vertikalnih in horizontalnih migracij, ki lahko omogočajo ekološko izolacijo in zadrževanje mesečink na specifičnem območju, četudi niso geografsko zelo oddaljene od drugih populacij (Cowen in sod., 2000) ali (ii) dotoka osebkov z vodnimi masami iz vzhodnega Sredozemlja (Zore-Armanda in sod. 1991), ki ima verjetno indopacifiški izvor. Za boljšo razjasnitev visoke variabilnosti južno Jadranskih mesečink bi potrebovali še dodatne vzorce iz Jadrana, Levantinskega bazena in Rdečega morja. Prav tako bi za opredelitev geografskega izvora in mej populacij mesečink v prihodnje morali izvesti bolj načrtno in obsežno vzorčenje in testirati tudi nove genetske markerje (npr. mikrosatelite).

5.1.2 Genetska diferenciacija v meroplanktonskih klobučnjaških meduzah

Nasprotno kot pri holoplanktonskih mesečinkah so filogeografske analize na osnovi zaporedij COI in ITS pri meroplanktonskih uhatih klobučnjakih v evropskih morjih razkrile geografsko bolj opredeljene filogeografske skupine. Glede na ugotovljeno zelo veliko genetsko diferenciacijo med kladi (velika genetska razdalja, > 10 % razlik v nukleotidnih zaporedjih) bi te dobro podprte linije morda lahko enačili s kriptičnimi vrstami. Tako so nekateri raziskovalci že predlagali razdelitev vrste *A. aurita* na še 10 novih kriptičnih vrst in jih poimenovali *Aurelia* sp. 1 – *Aurelia* sp. 10 (Dawson in Jacobs, 2001; Dawson in sod., 2005).

Na območju evropskih morij smo pri uhatih klobučnjakih nizko haplotipsko raznolikost COI (0,756) in ITS (0,583) ugotovili v kladu Jadransko morje (*Aurelia* sp. 8), kar je verjetno posledica življenja v robnem habitatu, saj je Jadransko morje (še posebej severni Jadran) zaključeno območje z bolj zaostrenimi in spreminjajočimi se klimatskimi in fizikalnimi pogoji, z ožino Otrantska vrata pa še dodatno izoliran od osrednjega Sredozemskega morja. V filogeografski študiji na pelaških ribah vrste *Sprattus sprattus* so zelo nizko genetsko raznolikost na območju evropskih morij tudi ugotovili v populaciji iz severnega Jadranskega morja (Debes in sod., 2008). Še nižjo haplotipsko raznolikost ima populacija uhatih klobučnjakov iz Baltskega morja, ki je tudi v primerjavi z ostalimi območji precej izoliran habitat s še bolj zaostrenimi pogoji (visoka slanost, veliko nihanje v letnih temperaturah).

Na filogenetskih drevesih na osnovi nukleotidnih zaporedij COI in ITS uhatih klobučnjakov iz evropskih morij smo prepoznali tri klade, ki imajo različno velike areale razširjenosti: klad Jadransko morje, klad Mljet, klad *borealis* (po Schrothu in sod., 2002). Glede na ugotovitve iz Dawsonove makro-morfološke študije (2003) haplotipi uvrščeni v klad *borealis* (haplotipi iz severnega Atlantskega oceana, Severnega in Baltskega morja, Črnega morja) pripadajo vrsti *A. aurita*. Sklicuje se na prvi taksonomski opis vrste *A. aurita* (Linnaeus, 1758), ki je bil narejen na osnovi meduz iz Baltskega morja. Sklep te študije je, da je vrsta pod imenom

A. aurita borealni endemit Atlantskega oceana in severnih evropskih morij. V nasprotju s klasično taksonomsko ureditvijo, kjer je vrsta *A. aurita* obravnavana kot kozmopolitska vrsta, so filogenetske študije vrst iz rodu *Aurelia* (Schroth in sod., 2002; Dawson in sod., 2005) razkrile, da bi po novem status kozmopolitske vrste pripadal kriptični vrsti *Aurelia* sp. 1. Schroth in sodelavci (2002) so v filogenetski analizi zaporedij ITS1 ugotovili, da primerki uhatih klobučnjakov iz atlantske in sredozemske obale Francije pripadajo kriptični liniji/vrsti *Aurelia* sp. 1, primerki iz Rdečega morja (skupina haplotipov poimenovana *Aurelia* TET) in sredozemske obale Francije pa liniji/vrsti *Aurelia* sp. 8. Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da imamo v Sredozemskem morju najmanj tri kriptične linije/vrste: *Aurelia aurita* (klad *borealis*), *Aurelia* sp. 5 (klad Mljet), *Aurelia* sp. 8 (klad Jadransko morje). Če pa upoštevamo rezultate Schrotha in sodelavcev (2002) ter razlago filogenije rodu *Aurelia* po Dawsonu in sodelavcih (2005) so v evropskih morjih prisotne štiri kriptične vrste: *A. aurita*, *Aurelia* sp. 1, *Aurelia* sp. 5, *Aurelia* sp. 8 (glej Preglednico 14). Sorodstveni odnosi med njimi pa ostajajo nepojasnjeni, saj se rezultati študij zelo razlikujejo. Dawson in sodelavci (2005) so na osnovi haplotipov COI določili, da sta si bolj sorodna klad *borealis* (*A. aurita*) in klad Jadransko morje (*Aurelia* sp. 8), medtem ko smo v naši študiji haplotipov COI ugotovil, da sta si bolj sorodna klad Jadransko morje (*Aurelia* sp. 8) in klad Mljet (*Aurelia* sp. 5).

Preglednica 14: Pregled kriptičnih linij/vrst v rodu *Aurelia* iz evropskih morij in povzetek uporabljenih genetskih markerjev.

Table 14: Review of cryptic species in genus *Aurelia* from european seas with summary of used genetic markers.

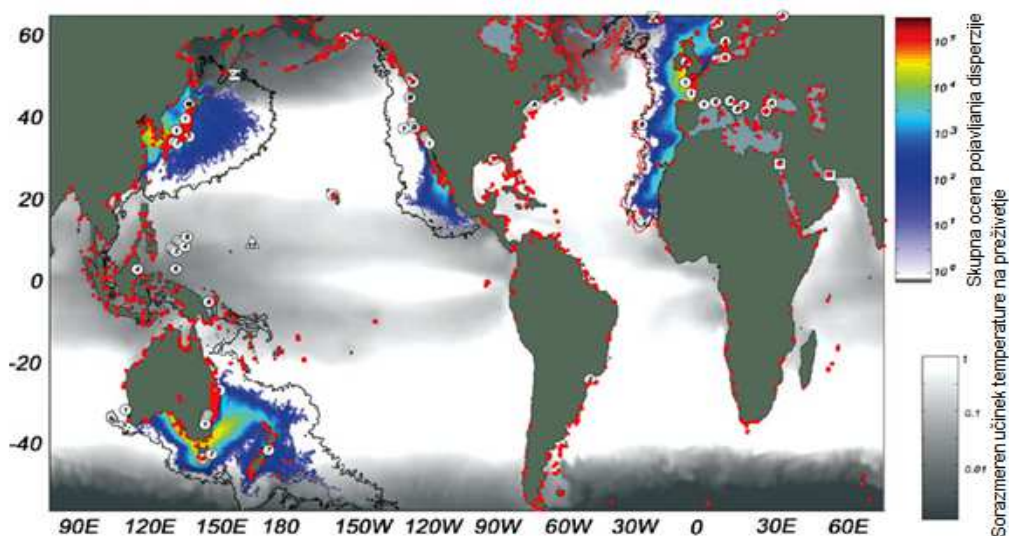
Geografsko območje	Kriptična linija/vrsta [#]	Genetski marker			
		COI	ITS1	16S rRNA	ITS1/ITS2
Črno morje	<i>Aurelia aurita</i>	B,C	A,B*,C	A	C
Baltsko morje	<i>Aurelia aurita</i>	C	A,B*,C	A	C
Severno morje	<i>Aurelia aurita</i>	B,C	A,B,C	A	B,C
SZ Atlantik	<i>Aurelia aurita</i>	B,C**	A,B	A	-
SV Atlantik	<i>Aurelia aurita</i>	B,C**	A,B*	A	-
	<i>Aurelia</i> sp. 1	-	A,B*	A	-
jezero Mljet	<i>Aurelia</i> sp. 5	B,C	A,B,C	A	B,C
Jadransko morje	<i>Aurelia</i> sp. 8	B,C	B,C	-	B,C
zahodno Sredozemlje	<i>Aurelia</i> sp. 8	-	A,B*,C**	A	-
	<i>Aurelia</i> sp. 1	-	A,B*	A	-
Rdeče morje	<i>Aurelia</i> sp. 8	-	A,B*,C**	A	-

poimenovanje po Dawsonu in sod. (2005), A - Schroth in sod. (2002), B - Dawson in sod. (2005), C - Stopar in sod. (2011), * podatki povzeti po raziskavi Schrotha in sod. (2002), ** podatki povzeti po raziskavi Dawsona in sod. (2005)

Na filogenetskih drevesih COI in ITS se haplotipi uhatih klobučnjakov iz Črnega morja združujejo v isti klad kot haplotipi geografsko oddaljenih območij severnega Atlantskega oceana, Severnega in Baltskega morja (klad *borealis*). Glede na tako homogeno genetsko strukturo geografsko precej oddaljenih populacij (populacija, ki danes naseljuje Črno morje, namreč ni neposredno geografsko povezana s populacijo v severnem Atlantiku, ampak je njun areal razširjenosti prekinjen z drugimi genetsko diferenciranimi linijami/kriptičnimi vrstami – *Aurelia* sp. 8, *Aurelia* sp. 1) se seveda zastavlja vprašanje, kateri dejavniki omogočajo in vzdržujejo takšno strukturo populacij. Številni raziskovalci se v primerih, ko

razširjenost filogeografskih linij ne upošteva hidrografske meje, najraje in najpogosteje sklicujejo na antropogene dejavnike prenosa, ki se na prvi pogled zdijo še najbolj logičen način za vzdrževanje takega strukturiranja in sposobnosti genskega pretoka (Greenberg in sod., 1996; Holland in Dawson, 2004; Dawson in sod., 2005). Veliko poročil sicer kaže, da sta Sredozemsko in Črno morje zaradi intenzivne pomorske trgovine preko ladijskega prometa povezani z večino svetovnih regij (CIESM, 2002; Gollasch, 2006), in vedno več je tudi primerov, ki poročajo o uspešni reprodukciji vrst klobučnjakov, ki jih ladje z balastnimi vodami prenesejo na novo območje (Dumont in sod., 2004; Dawson in sod., 2005; Galil in sod., 2009). Vendar v našem primeru to verjetno ni zadovoljiva razlaga, saj prav tako kot poteka ladijski transport z Atlantskim in Indijskim oceanom, še intenzivneje poteka med Sredozemskim in Črnim morjem, pa genetske analize med sledečima območjema kažejo statistično značilne in filogenetsko močno podprte razlike. Zato je bolj verjetno, da imajo pri meroplanktonskih vrstah kljub potencialnemu antropogenemu prenosu odločujočo vlogo na strukturiranje populacij ekološki dejavniki, ki verjetno vplivajo predvsem na polipno fazo (Schroth in sod., 2002). Dawson in sodelavci (2005) so za razlago svojih filogeografskih analiz uhatih klobučnjakov, ki vključuje tudi nekaj osebkov iz evropskih morij, sklopili genetske podatke s simulacijo migracije osebkov po svetovnih morjih in oceanih. Analiza je sicer bila bolj osredotočena na filogeografijo uhatih klobučnjakov v Tihem oceanu. Pri razlagi rezultatov filogenetske raziskave uhatega klobučnjaka so upoštevali rezultate simulacije migracije meduz uhatega klobučnjaka z globalnim Lagrangianovim modelom upoštevajoč številne fizikalno-oceanografske in biološke parametre. S simulacijo so določili skrajne meje možne migracije uhatih klobučnjakov (Slika 22). Kljub temu, da imajo uhati klobučnjaki zelo veliko sposobnost širjenja, pa se vzorec širjenja po predvidevanjih globalnega biofizikalnega oceanskega modela ne ujema povsem z dejansko filogeografsko strukturo. Avtorji v svoji študiji neujemanja razlagajo z antropogenim ladijskim prenosom. Njihov model migracije na območju evropskih morij vsebuje le podatke za Severno morje in severni Atlantski ocean, žal pa ne vsebuje podatkov o možni stopnji migracije v Sredozemskem, Rdečem in Črnem morju. Zato zaenkrat nimamo popolnega modela, s katerim bi lahko pojasnili dejanski načina širjenja uhatih klobučnjakov po Sredozemskem morju. Tako dejavnik, ki bi pojasnil disperzijo in ohranjanje genskega pretoka med haplotipi iz klada *borealis*, katerih razširjenost ne upošteva hidrografske meje, ostaja neznan. Zanimivo je tudi dejstvo, da so genetske razdalje med populacijo iz Črnega morja in obema atlantskima populacijama zelo nizke, medtem ko so velike genetske razdalje med geografsko bližnjima populacijama iz vzhodnega in zahodnega severnega Atlantika in med populacijama iz Severnega morja in severovzhodnega Atlantika. Na osnovi tega dejstva lahko sklepamo, da so populacije v severnem Atlantiku in Severnem morju izpostavljene manjšim selekcijskim pritiskom, med tem ko je populacija v Črnem morju verjetno zaradi bolj zaostrenih ekoloških pogojev manj variabilna (zelo nizka haplotipska raznolikost 0,653) in verjetno tudi najbolj podobna skupni izvorni populaciji oz. skupnemu predniku.

Močno podprte genetske linije (globoko razvejani filogeografski vzorci) uhatih klobučnjakov v evropskih morjih so tako verjetno odraz alopatrične speciacije zaradi divergentne selekcije in ekološke adaptacije, saj med genetskimi linijami uhatih klobučnjakov ni zaznani izolacije z razdaljo (Schroth in sod., 2002). Naše rezultate (večji nabor podatkov in uporaba drugih genetskih markerjev) smo primerjali z rezultati, ki so jih objavili Schroth in sodelavci (2002): (i) Preverili smo korelacijo med genetskimi in geografskimi razdaljami in izračunali nizek Mantelov korelacijski koeficient ($r = 0,21$), kar je v skladu z njihovimi rezultati. Model izolacije z razdaljo po pričakovanjih ni mogel zaznati nikakršne korelacije med genetsko diferenciacijo populacij in geografsko razdaljo, ker je statistično močno podprt klad *borealis*



Slika 22: Simulacija migracije meduz iz vrst rodu *Aurelia* z globalnim Lagrangianovim modelom upoštevajoč številne fizikalno-oceanografske in biološke parametre. Rdeče senčena območja predstavljajo izhodišče za začetek simulacije, s črno črto so označene skrajne meje možne migracije, sivo senčenje predstavlja inverzno stopnjo umrljivosti zaradi temperaturnih omejitev. Rdeče pike predstavljajo lokacije, kjer so po različnih virih opazili pojavljanje vrst iz rodu *Aurelia* (povzeto po Dawson in sod., 2005).

Figure 22: Simulation model of jellyfish migration for species of genus *Aurelia* with global Lagrangian model incorporating many physical-oceanographic and biological parameters. Red shaded regions indicate release sites, the black contour indicates extreme migration limits, grey shading indicates inverse mortality rates due to temperature thresholds. The red dots shows localities, where in different publications species of genus *Aurelia* has been reported to be occurred (reviewed in Dawson et al., 2005).

sestavljen iz uhatih klobučnjakov z različnih geografsko tudi precej oddaljenih območij (severni Atlantik, Severno in Baltsko morje, Črno morje). Nasprotno je na dveh sosednjih med seboj povezanih območjih (otok Mljet in Jadransko morje) opažena velika genetska diferenciacija obeh populacij. (ii) Preizkusili smo hipotezo ali okoljski dejavniki (minimalna zimska temperatura na vzorčnem mestu) pojasnjujejo filogeografijo rodu *Aurelia*. Z izračuni Mantelovega testa korelacije med najnižjimi zimskimi temperaturami in genetskimi razdaljami ($r = 0,903$) smo potrdili njihovo hipotezo. Verjetno pri meroplanktonskih klobučnjakih ekološke prilagoditve polipov (frekvenca strobilacije in sprožilna temperatura za začetek strobilacije) vplivajo na reprodukcijsko pregrado, ki nadalje vodi v genetsko diferenciacijo (Schroth in sod., 2002). Zdi se, da so pritrjeni polipi meroplanktonskih vrst bolj občutljivi na ekološke dejavnike (Schroth in sod., 2002) kot pelaške meduze. To je lahko vzrok za nastanek klada Jadransko morje (oz. sredozemsko-rdečemorskega klada, če vključimo še podatke drugih raziskovalcev) in klada *borealis*, vendar s tem ne pojasnimo nastanka ločenega genetskega sklada v jezerih na otoku Mljet, ker se Sredozemsko morje in jezera na Mljetu med seboj namreč ne razlikujejo v fizikalno-oceanografskih dejavnikih, saj imajo podoben razpon letnih temperatur, slanost in pH (Benović in sod., 2000).

Kateri dejavniki so potem vplivali na nastanek filogeografske skupine iz Velikega in Malega jezera na otoku Mljet? Meduze so v velikem številu v obeh jezerih prisotne tekom celotnega leta, medtem ko jih v Jadranskem morju opazimo le v obdobju od marca do julija (Benović in sod., 2000). Podobne fizikalno-oceanografske značilnosti ter 10 m široka in 2,5 m globoka

povezava jezer z Jadranskim morjem na prvi pogled ne predstavljata pregrade za genski pretok. Dejansko pa temu ni tako, kajti med obema populacijama je velika in z vsemi analizami statistično močno podprta genetska raznolikost. Slani med seboj povezani Veliko in Malo jezero na otoku Mljet sta po nastanku razmeroma novi območji, morska voda ju je napolnila pred cca. 7000 leti (Schmidt, 1993). Otok Mljet je neposredno izpostavljen in pod vplivom morskega toka, ki prihaja iz Jonskega morja (Zore-Amanda in sod., 1991). Verjetno pa vhodni tok iz Jonskega morja ne zajame plitkejših priobalnih in površinskih voda, ki jih naseljuje uhati klobučnjaki, in je tako onemogočen genski pretok z jadransko populacijo. Zato so mogoče mljetski haplotipi geografsko izolirani, že odkar sta jezera nastali in je z disperzijo tu nastal genetsko izoliran sklad. Podoben vzorec geografske izoliranosti mljetske populacije od zunanje-jadranske populacije so nedavno objavili tudi za nekatere druge zooplanktonske vrste. Npr. Peijnenburg in sod. (2011) so tako izolacijo opisali še za dve planktonski vrsti ščetinočeljjustnico *Sagitta setosa* in kopepoda *Calanus helgolandicus*, Benović in sod. (2000) pa so v Velikem jezeru odkrili novo vrsto hidromeduze iz rodu *Tima*, ki je tudi niso zasledili na nobeni drugi lokaciji v Sredozemlju. Med filogenetskimi skupinami uhatih klobučnjakov so raziskovalci zasledili tudi znake hibridizacije (Gershwin, 2001; Schroth in sod., 2002). Nasprotno Dawson in sodelavci (2005) v svoji študiji med kriptičnimi vrstami v rodu *Aurelia* niso odkrili nobenih sledov hibridizacije. Pri naših analizah regij ITS smo opazili, da je proces hibridizacije potekal med mljetsko in črnomorsko populacijo. Haplotipa AA2210 (Mljet) in AA2721 (Črno morje) imata namreč zapis v regiji ITS1 soroden haplotipom iz klada Mljet ter zapis v regiji ITS2 soroden haplotipom iz klada *borealis*. Schroth in sodelavci (2002) pa so odkrili hibridizacijo med linijo *borealis* in vrsto *A. limbata* ter med linijo Mljet in vrsto *A. limbata*, ki ju v naši raziskavi nismo zasledili. Rezultati analiz Dawsona in sodelavcev (2005) kažejo, da je *A. limbata* najbolj sorodna linijama *Aurelia* sp. 10 in *Aurelia* sp. 1. Verjetno je ohlajanje Sredozemskega morja ob koncu pleistocena (Hewitt, 1996) omogočilo invazijo hladnejših atlantskih linij (borealnih linij) uhatih klobučnjakov v Sredozemlje in nato v obdobju postglacialnega obdobja zaradi višanja morske gladine tudi v Črno morje (pred cca. 10000 leti) in v jezera na otoku Mljet (pred cca. 7000 leti). Tako je linija Mljet verjetno v jezerih na otoku Mljet ostala geografsko izolirana do danes, linija *borealis* pa se je ohranila v Črnem morju, ker je bila boljše ekološko prilagojena na nizke zimske temperature, ki so precej nižje kot v Sredozemskem morju (Schroth in sod., 2002). Haplotipi iz Jadranskega morja so verjetno ostanek populacije, ki je Sredozemsko morje naseljevala že v obdobju pleistocena.

Na filogenetskih drevesih uhatih klobučnjakov se še nekaj drugih haplotipov ni razvrstilo v skladu s svojim geografskim izvorom. Haplotipa AA_CO2 in AA_CO6 sta prisotna tako na območju Črnega morja kot Mljeta. Genetska razdalja (0,825) in razlike v nukleotidnih zaporedjih (17,4 %) med obema območjema so velike. Zaradi tako velike genetske diferenciacije med obema populacijama so raziskovalci opredelili, da naj bi bile to dve ločeni kriptični vrsti (Dawson in sod., 2005), zato bi mogoče omenjena skupna haplotipa lahko bila posledica hibridizacije, ki smo jo opazili tudi v haplotipih ITS, ali recentne speciacije. Če predpostavimo, da je do fragmentacije populacij prišlo šele nedavno, je v ločenih genetskih skladih še vedno lahko prisotnih nekaj podobnih haplotipov. Zato sta lahko novonastali vrsti v prvi fazi zaradi nepopolnega razvrščanja haplotipov parafiletski. Z vedno večjim časovnim odmikom od fragmentacije pa sklepamo, da bosta vrsti zaradi izplavljanja haplotipov postali monofiletski (Avice, 2000). Razvrščanje haplotipov AA2501, AA2711, AA2714, *Aurelia* sp. 2 in *Aurelia* sp. 9 med haplotipe klada *borealis* in klada Mljet na drevesih COI-ITS1-ITS2 in ITS1-ITS2 je lahko posledica hibridizacije ali pa velike variabilnosti regij ITS, ki tudi lahko onemogoči verodostojno rekonstrukcijo sorodstvenih odnosov. Regije ITS uhatih

klobučnjakov namreč glede na rezultate testa Iss niso najbolj primerne za filogenetske analize, ker so že preveč nasičene s substitucijami. Tudi pri nekaterih drugih vrstah so regije ITS zaradi neustrezne (prevelike/premale) variabilnosti bile potencialno neprimereni genetski markerji za filogenetske študije (Shearer in sod., 2002; Calderón in sod., 2006).

V meroplanktonskih velikih klobučnjakih v Sredozemskem morju genetsko strukturiranje populacij ni tako močno podprto kot pri uhatem klobučnjaku, vendar pa bolj kot pri holoplanktonskih mesečinkah, med katerimi nismo zaznali nikakršne strukture populacij v Sredozemskem morju in severnem Atlantiku. Rezultati filogeografskih analiz haplotipov ITS velikih klobučnjakov iz Sredozemskega morja odkrivajo eno močno podprto filogenetsko skupino. Analize z markerjem COI pa nakazujejo delno strukturiranost populacij iz severnega Jadrana in južnega Sredozemlja, vendar je ta delitev na filogenetskem drevesu slabo podprta, bolje je vidna v mreži haplotipov COI in izračunu genetskih razdalj.

Glede na trenutno razpoložljive genetske podatke je primerjava filogeografije vseh treh proučevanih vrst mogoča le za območje Sredozemskega morja. Primerjava z meroplanktonskimi uhatimi klobučnjaki iz Sredozemskega morja odkriva dva klada: klad Jadransko morje (*Aurelia* sp. 8) in klad Mljet - *Aurelia* sp. 5. Schroth in sodelavci (2002) pa so na območju sredozemske obale Francije zasledili poleg *Aurelia* sp. 8 (prisotna je tudi v Rdečem morju) še obstoj kozmopolitske *Aurelia* sp. 1, ki je prisotna tudi na območju atlantske obale Francije in je verjetno bila v Sredozemsko morje nedavno vnešena z ladijskim prenosom (Dawson in sod., 2005). Poudariti moramo, da veliki klobučnjaki niso prisotni v jezerih na otoku Mljet, zato je vprašanje le, kakšna je genetska diferenciacija velikih klobučnjakov v Črnem, Rdečem in Severnem morju v primerjavi z uhatimi klobučnjaki. Če je lastnost meroplanktonskih vrst res večja ekološka prilagodljivost predvsem polipov, potem bi v prihodnje z novimi vzorci iz teh območij morali zaznati večjo genetsko strukturiranost, tako kot je to opazno pri uhatih klobučnjakih iz klada *borealis*, ki združuje haplotipe iz severnega Atlantika, Severnega, Baltskega in Črnega morja. Novejše raziskave so med vrstama *R. pulmo* in *R. octopus* razkrile nekaj morfoloških razlik med polipi iz Severnega morja (*R. octopus*; Holst in sod., 2007) in zahodnega Sredozemlja (*R. pulmo*; Fuentes in sod., 2011) ter Črnega morja (*R. pulmo*; Paspaleff, 1938). Polipi iz vseh treh območij se med seboj razlikujejo po velikosti telesa, številu tentaklov in številu strobil na polip. Šele z nadaljnimi raziskavami pa bo mogoče potrditi, če se opažene morfološke razlike med vrstama *R. pulmo* in *R. octopus* odražajo tudi na genetskem nivoju.

Primerjava filogeografskih vzorcev uhatega in velikega klobučnjaka kaže, da slanost verjetno ni odločujoči dejavnik, ki bi vplival na strukturiranje in genetsko raznolikost populacij meroplanktonskih klobučnjakov. Uhati klobučnjaki iz Baltskega morja, kjer je slanost zelo nizka (4 – 10 ‰), so uvrščeni v isto filogeografsko skupino kot uhati klobučnjaki iz območij z višjo slanostjo (Črno morje – 18,5 ‰, Severno morje - 30 ‰ in Atlantski ocean - 36,15 ‰; Sorokin, 2002). Prav tako so pri velikih klobučnjakih haplotipi iz območij z različno slanostjo združeni v isto filogeografsko skupino. V Sredozemskem morju je namreč v povprečju slanost 37 - 39 ‰, medtem ko je v laguni Mar Menor (od tam so vzorci velikih klobučnjakov iz zahodnega Sredozemlja) višja slanost (40,8 – 44,8 ‰; Fuentes in sod., 2011).

Za meroplanktonske klobučnjaške meduze so v različnih svetovnih morjih na osnovi filogeografskih analiz značilne geografsko dobro opredeljene filogeografske skupine (Holland in sod., 2004; Dawson in sod., 2005; Dawson 2005a), še vedno pa niso dobro

pojasnjeni dejavniki, ki vplivajo na oblikovanje takih filogeografskih vzorcev. Ali ekološki dejavniki odločujoče vplivajo na filogeografijo klobučnjakov in kako močni so lahko njihovi vpliv na raznolikost COI haplotipov? Fragmenti COI uporabljeni v naših analizah so del funkcionalnega gena za prvo podenoto citokromske oksidaze in pri uhatih klobučnjakih niso selekcijsko nevtralni ($Z = 10,052$; $p = 0$), ampak so pod pozitivno selekcijo (število nesinonimnih substitucij je statistično pomembno večje od števila sinonimnih substitucij). Raziskovalci so pri drugih vrstah dokazali prilagodljivost encima COI na lokalno okolje glede na različne okoljske temperature (Blier in Lemieux, 2001; Somero, 2002). Pri razpravi o ekološki prilagodljivosti COI vsekakor moramo imeti v mislih celostno delovanje mitohondrija in vseh procesov v njem. Ballard in Melvin (2010) trdita, da mitohondriji s sposobnostjo hitre fiksacije mutacij lahko ključno določajo prilagoditev organizmov na določeno okolje. Tako prilagojeni genotipi so konkurenčnejši v danih razmerah okolja, zato se v večjem številu prenesejo v naslednjo generacijo. Njune ugotovitve tako dopolnjujejo vrzel v povezovanju mitohondrijskih genotipov s fenotipi organizmov in zmožnost preživetja le-teh v posebnem okolju. To pa so dejavniki, ki lahko imajo vpliv tudi na oblikovanje filogeografskih vzorcev.

Ali pa na večje filogeografsko strukturiranje populacij klobučnjakov vpliva način, kako odrasle meduze poskrbijo za svoje planule? Znano je, da nekatere klobučnjaške meduze po oploditvi planule še par dni prenašajo v notranjosti klobuka. Posledično ima odrasla planula krajši planktonski larvalni stadij in se hitreje pritrdi na substrat. Krajšanje planktonskega larvalnega stadija pa lahko vpliva na zmanjšanje potenciala širjenja. Vrste s slabšim potencialom širjenja imajo običajno bolj genetsko strukturirane populacije (Palumbi, 1994). Skrb za planule je značilna pri številnih meroplanktonskih vrstah: *Aurelia aurita* (Ishii in Båmstedt, 1998), *Catostylus mosaicus* (Dawson, 2005e), *Mastigias papua* (Sugiura, 1965), *Phyllorhiza punctata* (Rippingale in Kelly, 1995), *Cotylorhiza tuberculata* (Kikinger, 1992), *Cephea cephea* (Sugiura, 1966) in *Cassiopea andromeda* (Gohar in Eisawy, 1960). Pri mesečinkah in velikih klobučnjakih taka skrb za planule ni poznana (Rottini Sandrini in Avian, 1983; Holst in Jarms, 2007). Geografsko dobro opredeljene filogeografske vzorce so namreč poleg uhatih klobučnjakov ugotovili tudi v drugih meroplanktonskih vrstah, ki kažejo skrb za svoje planule in imajo zaradi tega verjetno bolj omejen potencial širjenja (*Catostylus mosaicus* (Dawson, 2005d), *Cassiopea andromeda* (Holland in sod., 2004) in *Mastigias papua* (Dawson, 2005 b, c)).

Naši rezultati skupaj z rezultati ostalih raziskovalcev (glej Preglednico 1) nakazujejo, da so pri klobučnjaških meduzah filogeografski vzorci verjetno vezani na značilnosti življenjskega cikla – velike genetsko enotne populacije v holoplanktonskih in več geografsko stukturiranih kladov v meroplanktonskih vrstah. V prihodnje bi bilo za trdnejšo podkrepitev te hipoteze smiselno opraviti še dodatne raziskave velikih klobučnjakov na vzorcih iz Črnega in Rdečega morja in na vzorcih vrste *Rhizostoma octopus* iz Severnega morja. Prav tako bi bilo dobro narediti filogeografsko študijo še na vzorcih meroplanktonskih vrst *Cotylorhiza tuberculata* in *Chrysaora hysoscela*, ki sta tudi prisotni klobučnjaški vrsti v evropskih morjih, čeprav se običajno ne pojavljajo v tako velikem številu kot veliki in uhati klobučnjaki. Med holoplanktonskimi vrstami klobučnjaških meduz pa bi zagotovo bilo vredno narediti še filogeografsko raziskavo v vrsti *Periphylla periphylla*, ki se množično pojavlja v Severnem morju in severnem Atlantskem oceanu (Jarms in sod., 1999).

Filogeografske raziskave klobučnjaških meduz nam omogočajo dodaten vpogled v razumevanje njihove biotske raznovrstnosti. Primerjava rezultatov študij klobučnjakov na

osnovi filogenetskih analiz s klasično taksonomsko ureditvijo nakazuje, da je zaradi pomankanja diagnostičnih morfoloških znakov verjetno ocena biodiverzitete klobučnjakov (Dawson, 2003) in tudi ostalih ožigalkarjev (Moura in sod., 2008) močno podcenjena. Filogeografske analize pri uhatem klobučnjaku (Schroth in sod., 2002; Dawson in sod., 2005; ta raziskava) so to potrdile. V poprej kozmopolitski vrsti *A. aurita* so ugotovili še vsaj 10 novih kriptičnih linij/vrst. Nove kriptične vrste so določili tudi v rodu *Mastigias* (Dawson, 2005b) in *Catostylus* (Dawson, 2005d). Nasprotno so Miranda in sodelavci (2010) na osnovi analiz z genetskimi markerji dokazali ravno obratno, da imamo po klasični taksonomski ureditvi na osnovi morfoloških značilnosti opisani dve vrsti (trdoživnjaka *Microhydrula limopscicola* in stauromeduzo *Haliclystus antarcticus*), ki pa imata identični genetski zapis. Avtorji zato predpostavljajo, da so verjetno vse vrste, ki so uvrščene v družino Microhydrulidae, v resnici polipna generacija od staurozojskih meduz (Staurozoa). Skupne analize morfoloških in molekulskih značilnosti polipnih in meduznih generacij klobučnjakov in sploh vseh ožigalkarjev so trenutno maloštevilne. Vendar pa za boljšo razrešitev sorodstvenih odnosov med klobučnjaki nujno potrebujemo čim več raziskav s skrbno primerjavo morfoloških in molekulskih analiz polipnih in meduznih generacij iz čim več geografskih območij. Šele tako bomo dobili celovit vpogled v dejansko stanje endemizma, kriptičnih vrst in verodostojnost morfološke taksonomske ureditve vrst klobučnjakov.

5.2 SKLEPI

Za kvalitetno izolacijo DNA iz tkiva klobučnjaških meduz je najbolje takoj po vzorčevanju tkivo shraniti v tekoči dušik ali zmrzovalnik na -80°C . Kot učinkovit konzervans se lahko uporablja absolutni etanol, aceton ali raztopina DMSO/NaCl. Najbolj učinkovita in preprosta metoda za izolacijo DNA iz koščka odrasle meduze (gonade, rob klobuka) je metoda DNeasy Blood and Tissue Kit z dodatkom RNaze A (Qiagen, Nemčija).

V vrstah klobučnjakov v zaporedjih COI ni vrzeli in polimorfizma dolžin (655bp). V medgenskih regijah rRNA operonov (ITS1 in ITS2) je večji polimorfizem v dolžinah zaporedij znotraj in med vrstami. Meroplanktonski uhati in veliki klobučnjaki imajo daljša zaporedja ITS z visoko stopnjo dolžinskega polimorfizma (767-843bp), medtem ko imajo holoplanktonske mesečinke krajše regije ITS brez polimorfizma dolžin (645bp). Mesečinke imajo višjo haplotipsko raznolikost COI kot meroplanktonski uhati in veliki klobučnjaki ($0,958 > 0,921 > 0,910$).

Analiza z mitohondrijskimi (COI) in jedrnimi (ITS1 in ITS2) markerji odkriva različne filogeografske vzorce v izbranih vrstah klobučnjaških meduz (Scyphozoa) v evropskih morjih:

(i) Filogeografske analize v holoplanktonskih mesečinkah (*Pelagia noctiluca*) ne kažejo nobene močno podprte genetske in geografske strukture populacij v Sredozemskem morju in severnem Atlantskem oceanu. Veliko mešanje haplotipov kaže na velik genski pretok med geografskimi regijami.

(ii) V meroplanktonskih uhatih klobučnjaki (*Aurelia aurita*) filogeografske analize v evropskih morjih in severozahodnem Atlantskem oceanu močno podpirajo razdelitev na več geografsko strukturiranih kladov. Genetska diferenciacija med kladi je velika in zelo visoke vrednosti vseh izračunanih parametrov genetske raznolikosti zato nakazujejo na številne kriптиčne linije/vrste znotraj rodu *Aurelia*.

(iii) Slabo podprta geografska strukturiranost populacij meroplanktonskih velikih klobučnjakov (*Rhizostoma pulmo*) na območju Sredozemskega morja je opazna v analizah na osnovi regij COI, medtem ko se v filogeografskih analizah na osnovi regij ITS vsi haplotipi razvrstijo le v eno močno podprto filogeografsko skupino.

Naši rezultati skupaj z rezultati ostalih raziskovalcev, nakazujejo, da so pri klobučnjaških meduzah filogeografski vzorci verjetno vezani na značilnosti življenjskega cikla – velike genetsko enotne populacije v holoplanktonskih in več geografsko strukturiranih kladov v meroplanktonskih vrstah.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

V evropskih morjih so pogosti množični pojavi velikih klobučnjakov (*Rhizostoma pulmo*), uhatih klobučnjakov (*Aurelia aurita*) in mesečink (*Pelagia noctiluca*). Poznavanje njihove genetske raznolikosti in genetske raznolikosti ostalih vrst klobučnjaških meduz (Scyphozoa) je v evropskih morjih, pa tudi ostalih svetovnih morjih, zelo skromno. Namen te raziskave je bil ugotoviti filogeografsko strukturo v izbranih vrstah klobučnjaških meduz (mesečinka, uhati in veliki klobučnjak), ki so bile vzorčevane v različnih geografskih območjih Sredozemskega in Črnega morja, severnega Atlantskega oceana, Severnega in Baltskega morja.

Optimizirali smo izolacijo genomske DNA iz tkiva klobučnjaških meduz (gonade ali rob klobuka). Če je le bilo mogoče, smo takoj po odvzemu vzorce shranili v tekoči dušik ali zamrzovalnik na -80°C . Kot učinkovit konzervans smo uporabljali absolutni etanol, aceton ali raztopino DMSO/NaCl. Ugotovili smo, da je najbolj učinkovita in preprosta izolacija genomske DNA iz koščka odrasle meduze po protokolu DNeasy Blood and Tissue Kit z dodatkom RNaze A (Qiagen, Nemčija), občasno pa smo uporabljali tudi protokol s CTAB in kloroform/izoamil alkoholom.

Iz delov mitohondrijskih (prva podenota citokromske oksidaze – COI) in jedrnih (medgenski regiji v operonu rRNA - ITS1 in ITS2) DNA smo pridobili polimorfna nukleotidna zaporedja, ki smo jih uporabili kot genetske markerje v filogeografskih analizah izbranih vzorčevanih vrst klobučnjaških meduz. Za regijo COI v mesečinki in velikem klobučnjaku smo v PCR uporabljali par začetnih oligonukleotidov LCO1490 in HCO2198 (Folmer in sod., 1994), prirejen par AU-LCO in AU-HCO pa za regijo COI v uhatem klobučnjaku. Za regijo ITS1 smo v vseh treh vrstah uporabljali par *its1* in *its2*, za regijo ITS2 pa par *its3* in *its4* (White in sod., 1990).

Pri vseh treh proučevanih vrstah v zaporedjih COI nismo zasledili vrzeli in polimorfizma dolžin (655bp). Večja variabilnost v dolžini zaporedij znotraj in med vrstami je bila najdena v regijah ITS1 in ITS2. Najdaljše regije ITS z visoko stopnjo dolžinskega polimorfizma so pri meroplanktonskima uhatem in velikem klobučnjaku (767-843bp), medtem ko ima holoplanktonska mesečinka krajše regije ITS brez polimorfizma dolžin (645bp). Mesečinka ima višjo haplotipsko raznolikost COI kot meroplanktonska uhati in veliki klobučnjak ($0,958 > 0,921 > 0,910$). V regijah ITS je bila odkrita najvišja haplotipska (0,952) in nukleotidna (13,44%) raznolikost v uhatih klobučnjakih.

V analizah z dvema neodvisnima genetskima markerjema, mitohondrijski fragment COI in jedrni fragment ITS1/ITS2, smo v evropskih morjih v treh vrstah klobučnjaških meduz odkrili različne filogeografske vzorce. Filogeografske analize v holoplanktonski mesečinki niso pokazale nobene močno podprte genetske in geografske strukture populacij v Sredozemskem morju in severnem Atlantskem oceanu. Veliko mešanje haplotipov kaže na velik genski pretok med geografskimi regijami. Gibraltarska ožina in Otrantska vrata za mesečinke ne predstavljata nepremostljive geografske pregrade za genski pretok. Na osnovi rezultatov te raziskave smo lahko razrešili dvoumnosti v tradicionalni taksonomski ureditvi

(Mayer, 1910; Kramp, 1961) in dokazali, da je v evropskih morjih in severozahodnem Atlantiku prisotna le ena vrsta mesečink - *Pelagia noctiluca*.

V meroplanktonskih uhatih klobučnjakih (*Aurelia aurita*) so filogeografske analize na vzorcih iz severnega Atlantskega oceana, Severnega in Baltskega morja, Sredozemskega in Črnega morja pokazale večjo genetsko strukturiranost glede na geografska območja. Med kladi uhatih klobučnjakov iz evropskih morjih in severozahodnega Atlantika je velika genetska diferenciacija. Genetske razdalje in razlike v nukleotidnih zaporedjih med filogenetskimi skupinami so zelo velike in zelo visoke vrednosti vseh izračunanih parametrov genetske raznolikosti zato nakazujejo na številne kriptične linije/vrste znotraj rodu *Aurelia*. V nasprotju s klasično taksonomsko ureditvijo, kjer je vrsta *A. aurita* obravnavana kot kozmopolitska vrsta, so filogeografske študije pokazale, da bi po novem status kozmopolitske vrste pripadal kriptični vrsti *Aurelia* sp. 1. Če povzamemo naše rezultate in rezultate filogeografskih študij ostalih raziskovalcev, ki so proučevali uhate klobučnjake, vidimo, da so v evropskih morjih štiri različne in geografsko dobro opredeljene filogeografske skupine/linije/kriptične vrste uhatih klobučnjakov: klad *borealis*, klad UBI (*Aurelia* sp. 1), klad Mljet (*Aurelia* sp. 5), klad Jadransko morje/TET (*Aurelia* sp. 8). Tako mitohondrijski kot jedrni podatki podpirajo enake filogeografske skupine, čeprav so odnosi med kladi nerazrešeni. Med filogeografskimi skupinami nismo ugotovili genskega pretoka in opazili smo, da za uhate klobučnjake Otrantska vrata, Sueški prekop in pas ožin med Severnim in Baltskim morjem ne predstavljajo geografske in ekološke pregrade za genski pretok.

V meroplanktonskih velikih klobučnjakih (*Rhizostoma pulmo*) filogeografske analize v vzorcih iz Sredozemskega morja niso pokazale tako očitne genetske strukturiranosti glede na geografske regije kot v uhatih klobučnjakih, slabo podprto geografsko strukturiranost populacij smo zasledili v analizah regij COI. Za velike klobučnjake visoka slanost v španski laguni Mar Menor očitno ni nepremostljiva ekološka pregrada za genski pretok, saj se populacija v laguni Mar Menor ne razlikuje od ostalih populacij v Sredozemskem morju. Odsotnost močno podprtih in zelo genetsko raznolikih kladov v filogeografskih analizah velikih klobučnjakov potrjuje skladnost s tradicionalno taksonomsko ureditvijo (Mayer, 1910; Kramp, 1961; Russel, 1970), da je v Sredozemskem morju prisotna le ena vrsta velikih klobučnjakov - *Rhizostoma pulmo*.

Naši rezultati skupaj z rezultati ostalih raziskovalcev nakazujejo, da so pri klobučnjaških meduzah filogeografski vzorci verjetno vezani na značilnosti življenjskega cikla – velike genetsko enotne populacije v holoplanktonskih in več geografsko stukturiranih kladov v meroplanktonskih vrstah. V prihodnje bi bilo za trdnejšo podkrepitev te hipoteze smiselno opraviti še dodatne raziskave na velikem klobučnjaku. Predvsem bi morali pridobiti vzorce iz Črnega in Rdečega morja, pa vzorce *Rhizostoma octopus* iz Severnega morja ter narediti raziskave na še kakšni holoplanktonski vrsti klobučnjaških meduz, kot je na primer *Periphylla periphylla*.

6.2 SUMMARY

In European seas blooms of barrel jellyfish (*Rhizostoma pulmo*), moon jelly (*Aurelia aurita*) and mauve stinger (*Pelagia noctiluca*) are frequently observed. But little is known about their genetic diversity and about genetic diversity of other scyphozoans too. In this respect, aim of

research was to evaluate genetic differentiation in selected scyphozoan jellyfish (barrel jellyfish, moon jelly and mauve stinger), which were sampled in different geographic regions of the Mediterranean and Black Sea, the north Atlantic Ocean, the North and Baltic Sea.

We have optimized the isolation of genomic DNA from tissue of scyphozoan jellyfish (gonads, bell margin). Wherever possible we stored tissue immediately after sampling in liquid nitrogen or freezer at -80°C . As a preservative was used absolute ethanol or acetone or solution of DMSO/NaCl. According to preliminary analysis as the most simple and efficient method for isolation of genomic DNA from a piece of adult jellyfish a protocol DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Germany) was selected and occasionally protocol with CTAB chloroform/isoamil alcohol was used.

From parts of mitochondrial (cytochrome oxidase subunit I - COI) and nuclear (intergenic region of rRNA operon - ITS1 and ITS2) DNA polymorphic sequences were amplified, which were used as genetic markers in phylogeographic analysis of selected sampled scyphozoan species. In PCR we used a pair of primers LCO1490 and HCO2198 (Folmer et al., 1994) for the COI region in mauve stinger and barrel jellyfish, modified pair AU-LCO and AU-HCO for the COI region in moon jelly. A pair *its1* and *its2* for ITS1 region and a pair *its3* and *its4* for ITS2 region were used (White et al., 1990).

In all three species no gaps and length polymorphism (655 bp) were detected in COI sequences. Higher variability in the length of sequence among and between species was found in the ITS1 and ITS2 regions of rRNA operons. The longest ITS regions with a high level of length polymorphism were observed in the meroplanktonic moon jelly and barrel jellyfish (767-843 bp), while holoplanktonic mauve stinger has obviously shorter ITS regions without length polymorphism (645 bp). Mauve stinger has a higher COI haplotype diversity than meroplanktonic moon jelly and barrel jellyfish ($0,958 > 0,921 > 0,910$, respectively). The highest haplotype (0,952) and nucleotide (13,44 %) diversity was observed in ITS regions of moon jelly.

Analysis with mitochondrial (COI) and nuclear (ITS1 and ITS2) markers revealed different patterns of genetic structuring in selected taxons of scyphozoan jellyfish from European seas. Phylogenetic analysis of holoplanktonic mauve stinger showed no strongly supported genetic and geographic structuring of populations in the Mediterranean Sea and the northern Atlantic Ocean. Good mixing of haplotypes indicates high gene flow between geographic regions. The Strait of Gibraltar and the Otranto Strait for mauve stingers do not serve as geographic barriers to gene flow. Results help us to resolve inconsistent differences within traditional taxonomic classification (Mayer, 1910; Kramp, 1961). We find out, that in European seas and northwestern Atlantic exist only one nominal species - *Pelagia noctiluca*.

The phylogeographic analysis of samples from the northern Atlantic Ocean, the North and Baltic Sea, the Mediterranean and Black Sea showed genetic structuring according to the geographic regions in meroplanktonic moon jelly (*Aurelia aurita*). Among moon jelly clades from European seas and northwestern Atlantic very high genetic differentiation was observed. Genetic distances and sequence differences among phylogenetic groups are very high and very high values of all genetic parameters suggesting many cryptic lineages/species in genus *Aurelia*. In contrast to classical taxonomic status, where *Aurelia aurita* treated as a cosmopolitan species, the phylogeographic studies of moon jelly now indicate, that the status of cosmopolitan species should belong to the genetic species of *Aurelia* sp. 1. A review of all

moon jelly phylogeographic studies revealed, that in European seas four genetic different and geographical well defined phylogeographic groups/lineages/cryptic species of moon jelly are present: clade *borealis*, clade UBI (*Aurelia* sp. 1), clade Mljet (*Aurelia* sp. 5), clade Adriatic Sea/TET (*Aurelia* sp. 8). Mitochondrial and nuclear data revealed the same phylogeographic groups, but relationships among clades could not be resolved. No gene flow was observed among phylogeographic groups and the Otranto Strait, the Suez Canal zone and straits between the North and Baltic Sea do not present phylogeographic break for moon jelly.

In meroplanktonic barrel jellyfish (*Rhizostoma pulmo*) the phylogeographic analyses with ITS marker in the Mediterranean Sea were not detected so obvious structuring of populations according to geographic region as in moon jelly, only in analysis of COI region weak structure was observed. High salinity in Spanish lagoon Mar Menor for barrel jellyfish do not serve as ecological barrier to gene flow, as population from Mar Menor does not genetically differ from other populations in Mediterranean Sea. In phylogeographic analysis no strongly supported and genetically very diverse clades were observed, this is consistent with traditional taxonomic classification (Mayer, 1910; Kramp, 1961; Russel, 1970), which for the Mediterranean Sea reported one species - *Rhizostoma pulmo*.

Our results together with results of other researchers suggest, that shape of scyphozoan jellyfish phylogeographic patterns are dependent on life-cycle characteristics - bigger genetic homogeneous populations in holoplanktonic and many geographically structured clads in meroplanktonic species. Therefore in future, further effort should be involved to obtain samples of barrel jellyfish from the Black and Red Sea and the samples of *R. octopus* from the North Sea. Also in holoplanktonic species of scyphozoan jellyfish (for example *Periphylla periphylla*, etc.) some further phylogeographic research would be appreciated.

7 VIRI

- Akaike H. 1973. Information theory as an extension of the maximum-likelihood principle. V: Petrov B., Csake F. (ur.) Second International Symposium on Information Theory. Akademiai Kiado, Budapest, str. 267-281.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1997. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Arai M. N. 1997. A Functional Biology of Scyphozoa. Chapman & Hall, London, 316 str.
- Arai M.N. 2001. Pelagic coelenterates and eutrophication: A review. *Hydrobiologia* 451: 69-87.
- Ates R.M.L. 1991. Predation on Cnidaria by vertebrates other than fishes. *Hydrobiologia* 216/217: 305-307.
- Attrill M.J., Wright J., Edwards M. 2007. Climate-related increases in jellyfish frequency suggest a more gelatinous future for the North Sea. *Limnology and Oceanography* 52: 480-485.
- Avise J.C., Arnold J., Ball R.M.Jr., Bermingham E., Lamb T., Niegel J.E., Reeb C.A., Saunders N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, str. 105-136.
- Avise J.C. 1992. Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos* 63: 62-76.
- Avise J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Anglija, 447 str.
- Avise J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36: 3-15.
- Ballard J.W.O., Kreitman M. 1995. Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker? *Trends in Ecology and Evolution* 10: 485-488.
- Ballard J.W.O., Melvin R.G. 2010. Linking the mitochondrial genotype to the organismal phenotype. *Molecular Ecology* 19: 1523-1539.
- Bargelloni L., Alarcon J.A., Alvarez M.C., Penzo E., Magoulas A., Reis C., Patarnello T. 2003. Discord in the family Sparidae (Teleostei): divergent phylogeographical patterns across the Atlantic-Mediterranean divide. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 1149-1158.
- Bargelloni L., Alarcon J.A., Alvarez M.C., Penzo E., Magoulas A., Palma J., Patarnello T. 2005. The Atlantic–Mediterranean transition: Discordant genetic patterns in two seabream species, *Diplodus puntazzo* (Cetti) and *Diplodus sargus* (L.). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 523-535.
- Baxter E.J., Walne A.W., Purcell J.E., McAllen R., Doyle T.K. 2010. Identification of jellyfish from Continuous Plankton Recorder samples. *Hydrobiologia* 645: 193-201.
- Bayha K.M., Harbison G.R., McDonald J.H., Gaffney P.M. 2004. Preliminary investigation on the molecular systematics of the invasive ctenophore *Beroe ovata*. V: *Aquatic Invasions in the Black, Caspian, and Mediterranean Seas*. Dumont H., Shiganova T. and Niermann U. (ur.), NATO Science Series, IV. Earth and Environmental Sciences 35: 167-175.

- Bayha K.M., Dawson M.N., Collins A.G., Barbeitos M.S., Haddock S.H.D. 2010. Evolutionary Relationships Among Scyphozoan Jellyfish Families Based on Complete Taxon Sampling and Phylogenetic Analyses of 18S in 28S Ribosomal DNA. *Integrative and Comparative Biology* 50(3): 436-455.
- Benović A., Lučić D., Onofri V., Peharda M., Carić M., Jasprica N., Bobanović-Čolić S. 2000. Ecological characteristic of the Mljet Island seawater lakes (South Adriatic Sea) with special reference to their resident populations of medusae. *Scientia Marina* 64(1): 197-206.
- Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N.S., Ng P.K.L., Meier R., Winkler K., Ingram K.K., Das I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22(3): 148-155.
- Blier P.U., Lemieux H. 2001. The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c oxidase on the respiration of Arctic charr red muscle mitochondria. *Journal of Comparative Physiology [B]* 171: 247-253.
- Boero F., Bouillon J., Gravili C., Miglietta M.P., Parsons T., Piraino S. 2008. Gelatinous plankton: irregularities rule the world (sometimes). *Marine Ecology Progress Series* 356: 299-310.
- Bolton T.F., Graham W.M. 2004. Morphological variation among populations of an invasive jellyfish. *Marine Ecology Progress Series* 278: 125-139.
- Boore J.L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27(8): 1767-1780.
- Borsa P., Naciri M., Bahri L., Chikhi L., García de León F.J., Kotoulas G., Bonhomme F. 1997. Intraspecific zoogeography of the Mediterranean: population genetic analysis on sixteen atlanto-mediterranean species (fish and invertebrates). *Vie milieu* 47: 295-305.
- Bowen B.W., Grant W.S. 1997. Phylogeography of the sardines (*Sardinops* spp.): assessing biogeographic models and population histories in temperature upwelling zones. *Evolution* 51(5): 1601-1610.
- Bremer J.R.A., Viñas J., Mejuto J., Ely B., Pla C. 2005. Comparative phylogeography of Atlantic bluefin tuna and swordfish: the combined effects of vicariance, secondary contact, introgression, and population expansion on the regional phylogenies of two highly migratory pelagic fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 169-187.
- Bridge D., Cunningham C.W., Schierwater B., DeSalle R., Buss L.W. 1992. Class-Level Relationship in the Phylum Cnidaria: Evidence from mitochondrial genome structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 8750-8753.
- Brodeur R.D., Decker M.B., Ciannelli L., Purcell J.E., Bond N.A., Stabeno P.J., Acuna E., Hunt G.L.Jr. 2008. Rise and fall of jellyfish in the eastern Bering Sea in relation to climate regime shifts. *Progress in Oceanography* 77: 103-111.
- Brown W.M., George Jr. M., Wilson A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 1967-1971.
- Bulmer M. 1991. The selection-mutation-drift theory of synonymous codon usage. *Genetics* 129: 897-907.
- Burnett J.W. 1991. Clinical manifestations of jellyfish envenomation. *Hydrobiologia* 216/217: 629-635.

- Burton R.S. 1998. Intraspecific phylogeography across the Point Conception biogeographic boundary. *Evolution* 52: 734-745.
- Calder D.R. 1971. Nematocysts of Polyps of *Aurelia*, *Chrysaora*, and *Cyanea*, and Their Utility in Identification. *Transactions of the American Microscopical Society* 90(3): 269-274.
- Calderón I., Garrabou J., Aurelle D. 2006. Evaluation of the utility of COI and ITS markers as tools for population genetic studies of temperate gorgonians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 336: 184-197.
- Chen C.A., Willis B.L., Miller D.J. 1996. Systematic relationships of the tropical corallimorpharians (Cnidaria: Anthozoa): utility of the 5.8S and internal transcribed spacers (ITS) of ribosomal DNA units. *Bulletin of Marine Science* 59: 269-281.
- Clement M., Posada D., Crandall K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659.
- CIESM 2001. Gelatinous zooplankton outbreaks: theory and practice. CIESM Workshop Series, Monaco 14: 112 str.
- CIESM 2002. Alien marine organisms introduced by ships in the Mediterranean and Black seas. CIESM Workshop Monographs, Monaco 20: 1-136.
- Collins A.G. 2002. Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 418-432.
- Collins A.G., Schuchert P., Marques A.C., Jankowski T., Medina M., Schierwater B. 2006. Medusozoan Phylogeny and Character Evolution Clarified by New Large and Small Subunit rDNA and an Assessment of the Utility of Phylogenetic Mixture Models. *Systematic Biology* 55(1): 97-115.
- Cowen R.K., Lwiza K.M.M., Sponaugle S., Paris C.B., Olson D.B., 2000. Connectivity of marine populations: open or closed? *Science* 287: 857-859.
- Daly M., Brugler M.R., Cartwright P., Collins A.G., Dawson M.N., Fautin D.G., France S.C., Mcfadden C.S., Opresko D.M., Rodriguez E., Romano S.L., Stake J.L. 2007. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa* 1668: 127-182.
- Daly Yahia M.N., Batistić M., Lucić D., Fernández de Puelles M., Licandro P., Malej A., Molinero J.C., Siokou-Frangou I., Zervoudaki S., Prieto L., Goy J., Yahia-Kéfi O. 2010. Are the outbreaks of *Pelagia noctiluca* (Forskål, 1775) more frequent in the Mediterranean basin? ICES Cooperative Research Report 300: 8-14.
- Dawson M.N. 2001. Phylogeography in costal marine animals: a solution from California? *Journal of Biogeography* 28: 723-736.
- Dawson M.N., Jacobs D.K. 2001. Molecular Evidence for Cryptic Species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa). *Biological Bulletin* 200: 92-96.
- Dawson M.N., Martin L.E. 2001. Geographic variation and ecological adaptation in *Aurelia* (Scyphozoa, Semaestomeae): some implications from molecular phylogenetics. *Hydrobiologia* 451: 259-273.

- Dawson M.N., Martin L.E., Penland L.K. 2001. Jellyfish swarms, tourists, and the Christ-child. *Hydrobiologia* 451: 131-144.
- Dawson M.N. 2003. Macro-morphological variation among cryptic species of the moon jellyfish, *Aurelia* (Cnidaria: Scyphozoa). *Marine Biology* 143: 369-379.
- Dawson M.N., Hamner W.M. 2003. Geographic variation and behavioral evolution in marine plankton: the case of *Mastigias* (Scyphozoa, Rhizostomeae). *Marine Biology* 143: 1161-1174.
- Dawson M.N. 2004. Some implications of molecular phylogenetics for understanding biodiversity in jellyfishes, with emphasis on Scyphozoa. *Hydrobiologia* 530/531: 249-260.
- Dawson M.N. 2005a. *Cyanea capillata* is not a cosmopolitan jellyfish: morphological and molecular evidence for *C. annaskala* and *C. rosea* (Scyphozoa: Semaestomeae: Cyaneidae) in south-eastern Australia. *Invertebrate Systematics* 19: 361-370.
- Dawson M.N. 2005b. Five new subspecies of *Mastigias* (Scyphozoa: Rhizostomeae: Mastigiidae) from marine lakes, Palau, Micronesia. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85: 679-694.
- Dawson M.N. 2005c. Morphological variation and systematics in the Scyphozoa: *Mastigias* (Rhizostomeae, Mastigiidae) – a golden unstandard? *Hydrobiologia* 537: 185-206.
- Dawson M.N. 2005d. Incipient speciation of *Catostylus mosaicus* (Scyphozoa, Rhizostomeae, Catostylidae), comparative phylogeography and biogeography in south-east Australia. *Journal of Biogeography* 32: 515-533.
- Dawson M.N. 2005e. Morphologic and molecular redescription of *Catostylus mosaicus conservativus* (Scyphozoa: Rhizostomeae: Catostylidae) from south-east Australia. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85: 723-731.
- Dawson M.N. 2005f. Renaissance taxonomy: integrative evolutionary analyses in the classification of Scyphozoa. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85: 733-739.
- Dawson M.N., Hamner W.M. 2005. Rapid evolutionary radiation of marine zooplankton in peripheral environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(26): 9235-9240.
- Dawson M.N., Gupta A.S., England M.H. 2005. Coupled biophysical global ocean model and molecular genetic analyses identify multiple introductions of cryptogenic species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(34): 11968-11973.
- Debes P.V., Zachos F.E., Hanel R. 2008. Mitochondrial phylogeography of the European sprat (*Sprattus sprattus* L., Clupeidae) reveals isolated climatically vulnerable populations in the Mediterranean Sea and range expansion in the northeast Atlantic. *Molecular Ecology* 17: 3873-3888.
- Demirov E., Pinardi N. 2002. Simulation of the Mediterranean Sea circulation from 1979 to 1993: Part I. The interannual variability. *Journal of Marine Systems* 33-34: 23-50.
- D'Ortezio F., Ribera d'Alcalà M.. 2009. On the trophic regimes of the Mediterranean Sea: a satellite analysis. *Biogeosciences* 6: 139-148.
- Dover G.A. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299: 111-117.

- Dowling D.K., Friberg U., Lindell J. 2008. Evolutionary implications of nonneutral mitochondrial genetic variation. *Trends in Ecology and Evolution* 23(10): 546-554).
- Doyle T.K., De Haas H., Cotton D., Dorschel B., Cummins V., Houghton J.D.R., Davenport J., Hays G.C. 2008. Widespread occurrence of the jellyfish *Pelagia noctiluca* in Irish coastal and shelf waters, *Journal of Plankton Research* 30: 963-968.
- Dumont H., Shiganova T., Niermann U. 2004. Aquatic Invasions in the Black, Caspian, and Mediterranean Seas. NATO Science Series, IV. Earth and Environmental Sciences 35.
- Dunn D.F. 1982. Cnidaria. V: Synopsis and classification of living things. Parker S.P. (ur.), McGraw-Hill, New York, str. 669-706.
- Dunn C.W., Hejnal A., Matus D.Q., Pang K., Browne W.E., Smith S.A., Seaver E., Rouse G.W., Obst M., Edgecombe G.D., Sørensen M.V., Haddock S.H.D., Schmidt-Rhaesa A., Okusu A., Kristensen R.M., Wheeler W.C., Martindale M.Q., Giribet G. 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452: 745-749.
- Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2571-2581.
- Edwards S.V., Beerli P. 2000. Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution* 54(6): 1839-1854.
- Elder J.F., Turner B.J. 1995. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology* 70(3): 297-320.
- Erpenbeck D., Hooper J.N.A., Wörheide G. 2005. CO1 phylogenies in diploblasts and the 'Barcoding of Life'-are we sequencing a suboptimal partition? *Molecular Ecology Notes* 6: 550-553.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to mitochondrial restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Fautin D.G., Fitt W.K. 1991. A jelly-fish sea anemone (Cnidaria, Actiniaria) from Palau: *Entacmaea medusivora* sp. nov. *Hydrobiologia* 216/217: 453-461.
- Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368-376.
- Fitch W.M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematics and Zoology* 20: 406-416.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase I subunit from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299.
- Forsman Z.H., Guzman H.M., Chen C.A., Fox G.E., Wellington G.M. 2005. An ITS region phylogeny of *Siderastrea* (Cnidaria: Anthozoa): is *S. glynni* endangered or introduced? *Coral Reefs* 24: 343-347.
- Franqueville C. 1970. Etude comparative de macroplankton en Méditerranée nord occidentale par plongées en soucoupe SP 350, et pêches au chalut pélagique. *Marine Biology* 5: 172-179.

- Frézal L., Leblois R. 2008. Four years of DNA barcoding: Current advantages and prospects. *Infection, Genetics and Evolution* 8(5): 727-736.
- Fu Y.X. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-600.
- Fuentes V.L., Angel D.L., Bayha K.M., Atienza D., Edelist D., Bordehore C., Gili J.M., Purcell J.E. 2010. Blooms of the invasive ctenophore, *Mnemiopsis leidyi*, span the Mediterranean Sea in 2009. *Hydrobiologia*. 645(1): 23-37.
- Fuentes V.L., Straehler-Pohl I., Atienza D., Franco I., Tilves U., Gentile M., Acevedo M., Olariaga A., Gili J.M. 2011. Life cycle of the jellyfish *Rhizostoma pulmo* (Scyphozoa: Rhizostomeae) and its distribution, seasonality and inter-annual variability along the Catalan coast and the Mar Menor (Spain, NW Mediterranean). *Marine Biology*, DOI 10.1007/s00227-011-1730-7.
- Gačić M., Eusebi Borzelli G.L., Civitarese G., Cardin V., Yari S. 2010. Can internal processes sustain reversal of the ocean upper circulation? The Ionian Sea example. *Geophysical Research Letters* 37: L09608.
- Galil B.S. 2009. Taking stock: inventory of alien species in the Mediterranean Sea. *Biological Invasions* 11(2): 359-372.
- Gershwin L.A. 2001. Systematics and Biogeography of the Jellyfish *Aurelia labiata* (Cnidaria: Scyphozoa). *Biological Bulletin* 201: 104-119.
- Gershwin L.A., Collins A.G. 2002. A preliminary phylogeny of Pelagiidae (Cnidaria, Scyphozoa), with new observations of *Chrysaora colorata* comb. nov. *Journal of Natural History* 36: 127-148.
- Gohar H.A.F., Eisawy A.M. 1960. The development of *Cassiopea andromeda* (Scyphomedusae). *Publication of Marine Biology Station Ghardaqa* 11: 147-190.
- Gibbons M.J., Richardson A.J. 2009. Patterns of jellyfish abundance in the North Atlantic. *Hydrobiologia* 616: 51-65.
- Gollasch S. 2006. Overview on introduced aquatic species in European navigational and adjacent waters. *Helgoland Marine Research* 60: 84-89.
- Govindarajan A.F., Halanych K.M., Cunningham C.W. 2005. Mitochondrial evolution and phylogeography in the hydrozoan *Obelia geniculata* (Cnidaria). *Marine Biology* 146: 213-222.
- Govindarajan A.F., Boero F., Halanych K.M. 2006. Phylogenetic analysis with multiple markers indicates repeated loss of the adult medusa stage in Campanulariidae (Hydrozoa, Cnidaria). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 820-834.
- Goy J., Dalot S., Morand P. 1989. Long term fluctuations of *Pelagia noctiluca* (Cnidaria, Scyphomedusae) in the western Mediterranean Sea. *Deep Sea Research* 36: 269-279.
- Greenberg N., Garthwaite R.L., Potts D.C. 1996. Allozyme and morphological evidence for a newly introduced species of *Aurelia aurita* in San Francisco Bay, California. *Marine Biology* 125: 401-410.
- Gu X., Fu Y.X., Li W.H. 1995. Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites. *Molecular Biology and Evolution* 12: 546-557.

- Guindon S., Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematics and Biology* 52: 696-704.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hall B.G. 2008. *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-to Manual*, 3rd edition, Sinauer Associates, Massachusetts, 233 str.
- Hamner W.M., Janssen R.M. 1974. Growth, degrowth, and irreversible cell differentiation in *Aurelia aurita*. *Animal Zoology* 14: 833-849.
- Hamner W.M., Hamner P.P., Strand S.W. 1994. Sun-compass migration by *Aurelia aurita* (Scyphozoa): population retention and reproduction in Saanich Inlet, British Columbia. *Marine Biology* 119: 347-356.
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22(2): 160-74.
- Hastings W. 1970. Monte-Carlo sampling methods using Markov Chains and their applications. *Biometrika* 57: 97-109.
- Hay S. 2006. Marine Ecology: Gelatinous Bells May Ring Change in Marine Ecosystems. *Current Biology* 16(17): 679-682.
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S., de Waard J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergence among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 96-99.
- Hellberg M.E. 2006. No variation and low synonymous substitution rates in coral mtDNA despite high nuclear variation. *BMC Evolutionary Biology* 6: 24.
- Hemrich G., Anokhin B., Zacharias H., Bosch T.C.G. 2007. Molecular phylogenetics in *Hydra*, a classical model in evolutionary developmental biology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 281-290.
- Hessinger D.A., Lenhoff H.M. 1988. *The Biology of Nematocysts*. Academic Press, San Diego.
- Hewitt G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Holland B.S., Dawson M.N., Crow G.L., Hofmann D.K. 2004. Global phylogeography of *Cassiopea* (Scyphozoa: Rhizostomeae): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands. *Marine Biology* 145: 1119-1128.
- Holst S., Jarms G. 2007. Substrate choice and settlement preferences of planula larvae of the Scyphozoa (Cnidaria) from German Bight, North Sea. *Marine Biology* 151: 863-871.
- Holst S., Sötje I., Tiemann H., Jarms G. 2007. Life cycle of the rhizostome jellyfish *Rhizostoma octopus* (L.) (Scyphozoa, Rhizostomeae), with studies on cnidocysts and statoliths. *Marine Biology* 151: 1695-1710.

- Hoover R.A., Purcell J.E. 2009. Substrate preferences of scyphozoan *Aurelia labiata* polyps among common dock-building materials. *Hydrobiologia* 616: 259-267.
- Houghton J.D.R., Doyle T.K., Davenport J., Hays G.C. 2006. Developing a simple, rapid method for identifying and monitoring jellyfish aggregations from the air. *Marine Ecology Progress Series* 314: 159-170.
- Huang D., Meier R., Todd P.A., Chou L.M. 2008. Slow mitochondrial COI Sequence Evolution at the Base of the Metazoan Tree and Its Implications for DNA Barcoding. *Journal of Molecular Evolution* 66: 167-174.
- Huelsenbeck J.P., Hillis D. 1993. Success of phylogenetic methods in the fourtaxon case. *Systematics and Biology* 42: 247-264.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F., Nielsen R., Bollback J.P. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-2314.
- Ishii H., Båmstedt U. 1998. Food regulation of growth and maturation in a natural population of *Aurelia aurita* (L.). *Journal of Plankton Research* 20: 805-816.
- Jarms G., Båmstedt U., Tiemann H., Martinussen M.B., Fosså J.H. 1999. The holopelagic life cycle of deep-sea medusa *Periphylla periphylla* (Scyphozoa, Coronate). *Sarsia* 84: 55-65.
- Katoh, Kumar, Toh, Miyata 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment (describes [ancestral versions of] G-INS-i, L-INS-i and E-INS-i strategies). *Nucleic Acid Research* 33: 511-518.
- Kawecki T. 2004. Ecological and evolutionary consequences of source-sink population dynamics. V: Hanski I., Gaggiotti O.E. (ur.) *Ecology, Genetics, and Evolution of Metapopulations*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, str. 387-414.
- Keane T.M., Creevey C.J., Pentony M.M., Naughton T.J., McInerney O.J. 2006. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are justified. *BMC Evolutionary Biology* 6: 29.
- Ki J.S., Kim I.C., Lee J.S. 2009. Comparative analysis of nuclear ribosomal DNA from the moon jelly *Aurelia* sp. 1 (Cnidaria: Scyphozoa) with characterizations of the 18S, 28S genes, and the intergenic spacer (IGS). *Hydrobiologia* 616: 229-239.
- Ki J.S., Hwang D.-S., Shin K.S., Yoon W.D., Lim D.H., Kang Y.S., Lee Y., Lee J.S. 2008. Recent moon jelly (*Aurelia* sp. 1) blooms in Korean coastal waters suggest on a global expansion: Examples inferred from mitochondrial COI and nuclear ITS-5.8S rDNA sequences, *ICES Journal of Marine Science*, March.
- Kideys A.E. 2002. Fall and Rise of the Black Sea Ecosystem. *Science* 297: 1482-1484.
- Kikinger R. 1992. *Cotylorhiza tuberculata* (Cnidaria: Scyphozoa) - life history of a stationary population. *Marine Ecology* 13: 333-362.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kimura M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78(1): 454 - 458.

- Kimura M. 1983. The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kimura M., Weiss G.H. 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49: 561-576.
- Knowlton N. 1993. Sibling Species in the Sea. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 189-216.
- Knowlton N. 2000. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia* 420: 73-90.
- Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Paabo S., Villablanca F.X., Wilson A.C. 1989. Dynamics of Mitochondrial DNA Evolution in Animals: Amplification and Sequencing with Conserved Primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 6196-6200.
- Kogovšek T., Bogunovič B., Malej A. 2010. Recurrence of bloom-forming scyphomedusae: wavelet analysis of a 200 year time series. *Hydrobiologia* 217: 81-96.
- Kramp P.L. 1961. Synopsis of the medusae of the world. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 40: 5-469.
- Krijgsman W., Hilgen F.J., Raffi I., Sierro F.J., Wilson D.S. 1999. Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature* 400: 652-655.
- Lafontaine D.L.J., Tollervey D. 2001. Ribosomal RNA. *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group (www.els.net), str. 1-7.
- Larson R.J. 1987. A Note on the Feeding, Growth, and Reproduction of the Epipelagic Scyphomedusa *Pelagia noctiluca* (Forskål). *Biology and Oceanography* 4(4): 447-454.
- Lesh-Laurie G.E., Hujer A., Suchy P. 1991. Polyp regeneration from isolated tentacles of *Aurelia scyphistomae*: a role for gating mechanisms and cell division. *Hydrobiologia* 216/217: 91-97.
- Liao D. 1999. Concerted Evolution: Molecular Mechanism and Biological Implications. *American Journal of Human Genetics* 64: 24-30.
- Librado P., Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(11): 1451-1452.
- Licandro P., Conway D.V.P., Daly Yahia M.N., Fernandez de Puelles M.L., Gasparini S., Hecq J.H., Tranter P., Kirby R.R. 2010. A blooming jellyfish in the northeast Atlantic and Mediterranean. *Biological Letters*, doi:10.1098/rsbl.2010.0150.
- Lilley M.K.S., Houghton J.D.R., Hays G.C. 2009. Distribution, extent of inter-annual variability and diet of the bloom-forming jellyfish *Rhizostoma* in European waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, doi:10.1017/S0025315408002439.
- Liu W.C., Lo W.T., Purcell J.E., Chang H.H. 2009. Effects of temperature and light intensity on asexual reproduction of the scyphozoan *Aurelia aurita* (L.) in Taiwan. *Hydrobiologia* 616: 247-258.
- Lucas C.H. 2001. Reproduction and life history strategies of the common jellyfish, *Aurelia aurita*, in relation to its ambient environment. *Hydrobiologia* 451: 229-246.

- Luttikhuisen P.C., Campos J., van Bleijskwijk J., Peijnenburg K.T.C.A., van der Veer H.W. 2008. Phylogeography of the common shrimp, *Crangon crangon* (L.), across its distribution range. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 1015-1030.
- Lynam C.P., Hay S.J., Brierley A.S. 2004. Interannual variability in abundance of North Sea jellyfish and links to the North Atlantic Oscillation. *Limnology and Oceanography* 49(3): 637-643.
- Lynam C.P., Gibbons M.J., Axelsen B.E., Sparks C.A.J., Coetzee J., Heywood B.G., Brierley A.S. 2006. Jellyfish overtake fish in a heavily fished ecosystem. *Current Biology* 16: 492-493.
- Mackie G.O., Larson R.J., Larson K.S., Passano L.M. 1981. Swimming and vertical migration of *Aurelia aurita* (L.) in a deep tank. *Marine Behavior Physiology* 7:321-329.
- Malačič V., Petelin B., Malej A. 2007. Advection of the jellyfish *Pelagia noctiluca* (Scyphozoa) studied by the Lagrangian tracking of water-mass in the climatic circulation of the Adriatic Sea. *Geophysical Research Abstracts* 9, 16077962/gra/EGU2007-A-02802.
- Malej A., Faganeli J., Pezdič J. 1993. Stable isotope and biochemical fractionation in the marine pelagic food chain: the jellyfish *Pelagia noctiluca* and net zooplankton. *Marine Biology* 116: 565-570.
- Malej A., Malej A. Jr. 2004. Invasion of Jellyfish *Pelagia noctiluca* in the Northern Adriatic: non-success story. V: *Aquatic Invasions in the Black, Caspian, and Mediterranean Seas*. Dumont H. et al. (ur.), Kluwer Academic Publishers, str. 273-285.
- Manca B.B., Budillon G., Scarazzato P., Ursella L. 2003. Evolution of dynamics in the eastern Mediterranean affecting water mass structures and properties in the Ionian and Adriatic Seas. *Journal of Geophysical Research* 108(C9): 8102.
- Marques A.C., Collins A.G. 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology* 123(1): 23-42.
- Martínez D.E., Iñiguez A.R., Percell K.M., Willner J.B., Signorovitch J., Campbell R.D. 2010. Phylogeny and biogeography of *Hydra* (Cnidaria: Hydridae) using mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 403-410.
- Maruyama T., Fuerst P.A. 1984. Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. I. Allele numbers when populations evolve from zero variability. *Genetics* 108: 745-763.
- Matsumura K., Kamiya K., Yamashita K., Hayashi F., Watanabe I., Murao Y., Miyasaka H., Kamimura N., Nogami M. 2005. Genetic polymorphism of the adult medusae invading an electric power station and wild polyps of *Aurelia aurita* in Wakasa Bay, Japan.
- Mayer A.G. 1910. *Medusae of the World III: the Scyphomedusae*. Carnegie Institution of Washington, Washington D.C., 735 str.
- McVean G.A.T., Vieira J. 2001. Inferring parameters of mutation, selection, and demography from patterns of synonymous site evolution in *Drosophila*. *Genetics* 157: 245-257.
- Meroz-Fine E., Brickner I., Loya Y., Ilan M. 2003. The hydrozoan coral *Millepora dichotoma*: Speciation or phenotypic plasticity? *Marine Biology* 143(6): 1175-1183.
- Metropolis N., Rosenbluth A., Rosenbluth M., Teller A., Teller E. 1953. Equations of state calculations by fast computing machines. *Journal of Chemistry and Physics* 21: 1087-1091.

- Mianzan H., Cornelius P.F.S. 1999. Cubomedusae and Scyphomedusae. V: South Atlantic Zooplankton. Boltovskoy D. (ur.), BACKHUYS Publishers, Leiden, str. 513-559.
- Millot C., Taupier-Letage I. 2005. Circulation in the Mediterranean Sea. V: Saliot A. (ur.) The Handbook of Environmental Chemistry. 5K, Springer-Verlag Heidelberg, str. 29-66.
- Mills C.E. 1995. Medusae, siphonophores, and ctenophores as planktivorous predators in changing global ecosystems. ICES Journal of Marine Science 52: 575-581.
- Mills C.E. 2001. Jellyfish blooms: Are populations increasing globally in response to changing ocean conditions? Hydrobiologia 451: 55-68.
- Miranda L.S., Collins A.G., Marques A.C. 2010. Molecules Clarify a Cnidarian Life Cycle – The "Hydrozoan" *Microhydrula limopsicola* Is an Early Life Stage of the Staurozoan *Halicystus antarcticus*. PLOS ONE 5(4): 10182.
- Miyake H., Terazaki M., Kakinuma Y. 2002. On the Polyps of the Common Jellyfish *Aurelia aurita* in Kogoshima Bay. Journal of Oceanography 58: 451-459.
- Molinero J.C., 2008. The influence of the Atlantic and regional climate variability on the long-term changes in gelatinous carnivore populations in the northwestern Mediterranean. Limnology and Oceanography 53(4): 1456-1467.
- Morales-Alamo R., Haven D.S. 1974. Atypical Mouth Shape of Polyps of the Jellyfish, *Aurelia aurita*, from Chesapeake Bay, Delaware Bay, and Gulf of Mexico. Chesapeake Science 15(1): 22-29.
- Morand P., Dallot S. 1985. Variations annuelles et pluriannuelles de quelques especes du macroplankton cotier de la mer Ligure (1898-1914). Rapports et Proces-Verbaux des Réunions. Commission Internationale Pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranee 29: 285-287.
- Moura C.J., Harris D.J., Cunha M.R., Rogers A.D. 2008. DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deep sea environments. Zoologica Scripta 37: 93-108.
- Muhammed F., Sultana R. 2007. New record of edible jellyfish, *Rhizostoma pulmo* (Cnidaria: Scyphozoa: Rhizostomidae) from Pakistani waters. Journal of Marine Biology Association – Biodiversity Records, published on-line.
- Nastasi A. 2010. Algal and Jellyfish Blooms in the Mediterranean and Black Sea: a brief review. GFCM Workshop on Algal and Jellyfish Blooms in the Mediterranean and Black Sea, 6-8 October 2010: 1-56.
- Needleman S.B., Wunsch C.D. 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. Journal of Molecular Biology 48: 443-453.
- Neethling M., Matthee C.A., Bowie R.C.K., von der Heyden S. 2008. Evidence for panmixia despite barriers to gene flow in the southern African endemic *Caffrogobius caffer* (Teleostei: Gobiidae). BMC Evolutionary Biology 8: 325.
- Nei M.T., Maruyama T., Chakraborty R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution 29: 1-10.

- Novembre J.A. 2002. Accounting for Background Nucleotide Composition When Measuring Codon Usage Bias. *Molecular Biology and Evolution* 19: 1390–1394.
- Omori M., Nakano E. 2001. Jellyfish fisheries in southeast Asia. *Hydrobiologia* 451: 19-26.
- Ortman B.D., Bucklin A., Pagès F., Youngbluth M. 2010. DNA Barcoding the Medusozoa using mtCOI. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 57(24-26): 2148-2156.
- Palumbi S.R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25: 547-572.
- Paspaleff G.W. 1938. Über die Entwicklung von *Rhizostoma pulmo* Agassis. *Arb. biol. Meeresst Varna* 7:1-17.
- Patarnello T., Volckaert F.A.M.J., Castilho R. 2007. Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology* 16: 4426-4444.
- Pauly D., Graham W., Libralato S., Morissette L., Deng Palomares M.L. 2009. Jellyfish in ecosystems, online databases, and ecosystem models. *Hydrobiologia* 616: 67-85.
- Peijnenburg K.T.C.A., Breeuwer J.A.J., Pierrot-Bults A.C., Menken S.B.J. 2004. Phylogeography of the planktonic chaetognath *Sagitta setosa* reveals isolation in European Seas. *Evolution* 58: 1472-1487.
- Peijnenburg K., Batistić M., Becking L.E., Garić R.. 2011. Zooplankton populations isolated in marine lakes: Natural laboratories of evolution. Population Connections, Community Dynamics, and Climate Variability. 5th International Zooplankton Production Symposium. Program and Abstracts, Pucon, Čile, 14-18 March 2011.
- Pelc R.A., Warner R.R., Gaines S.D. 2009. Geographical patterns of genetic structure in marine species with contrasting life histories. *Journal of Biogeography* 36: 1881-1890.
- Perez-Ruzafa A., Gailabert J., Gutierrez J.M., Fernandez A.I., Marcos C., Sabah S. 2002. Evidence of a planctonic food web response to changes in nutrient input dynamics in the Mar Menor coastal lagoon, Spain. *Hydrobiologia* 475: 359-369.
- Petersen K.W. 1979. Development of coloniality in Hydrozoa. V: Biology and Systematics of Colonial Organisms. Larwood G. in Rosen B. R. (ur.), Academic Press, New York, str. 105–139.
- Pfenninger M., Posada D. 2002. Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution* 56: 1776-1788.
- Pingree R.D. 2002. Ocean structure and climate (Eastern North Atlantic): in situ measurements and remote sensing (altimeter). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 82: 681-707.
- Polanco C., González A.I., de la Fuente Á., Dover G.A. 1998. Multigene Family of Ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* Reveals Contrasting Patterns of Homogenization for IGS and ITS Spacer Regions: A Possible Mechanism to Resolve This Paradox. *Genetics* 149: 243-256.
- Posada D., Crandall K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817-818.

- Posada D., Crandall K.A. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 35-47.
- Purcell J.E. 1991. A review of cnidarians and ctenophores feeding on competitors in the plankton. *Hydrobiologia* 216/217: 335-342.
- Purcell J.E., Malej A., Benović A. 1999. Potential Links of Jellyfish to Eutrophication and Fisheries. *Costal and Estaurine Studies* 55: 241-263.
- Purcell J.E., Brown E.D., Stokesbury K.D.E., Haldorson L.H., Shirley T.C. 2000. Aggregations of the jellyfish *Aurelia labiata*: abundance, distribution, association with age-0 walleye pollock, and behaviors promoting aggregations in Prince William Sound, Alaska, USA. *Marine Ecology Progress Series* 195: 145-158.
- Purcell J.E. 2005. Climate effects on formation of jellyfish and ctenophore blooms: a review. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85: 461-476.
- Purcell J.E., Uye S.I., Lo W.T. 2007. Antropogenic causes of jellyfish blooms and their direct consequences for humans: a review. *Marine Ecology Progress Series*. 350: 153-174.
- Rambaut A., Drummond A.J. 2009. TRACER: MCMC trace analysis tool. 1.4.1 edition. Edinburgh: Institute of Evolution Biology <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>.
- Rambaut A. 2006. Tree Figure Drawing Tool Version 1.2.2. <http://tree.bio.ed.ac.uk>, Edinburgh.
- Ramos-Onsins S., Rozas J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.
- Rannala B., Yang Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Ecology* 43: 304-311.
- Reid J.L. 1994. On the total geostrophic circulation of the North Atlantic Ocean: flow patterns, tracers and transports. *Progress in Oceanography* 33: 1-92.
- Richardson A.J., Gibbons M.J. 2008. Are jellyfish increasing in response to ocean acidification? *Limnology and Oceanography* 53(5): 2040-2045.
- Richardson A.J., Bakun A., Hays G.C., Gibbons M.J. 2009. The jellyfish joyride: causes, consequences and management responses to a more gelatinous future. *Trends in Ecology and Evolution* 24(6): 312-322.
- Rippingale R.J., Kelly S.J. 1995. Reproduction and survival of *Phyllorhiza punctata* (Cnidaria: Rhizostomeae) in a seasonally fluctuating salinity regime in Western Australia. *Marine Freshwater Research* 46: 1145-1151.
- Rogers A.R., Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rottini Sandrini L., Avian M. 1983. Biological cycle of *Pelagia noctiluca*: morphological aspects of the development from planula to ephyra. *Marine Biology* 74: 169-174.

- Rottini Sandrini L., Avian M., Axiak V., Malej A. 1984. The breeding period of *Pelagia noctiluca* (Scyphozoa, Semaestomeae) in the Adriatic and central Mediterranean Sea. *Nova Thalassia* 6: 65-75.
- Rottini Sandrini L., Avian M. 1991. Reproduction of *Pelagia noctiluca* in the central and northern Adriatic Sea. *Hydrobiologia* 216/217: 197-202.
- Russell F.S. 1970. The Medusae of the British Isles: II. Pelagic Scyphozoa with a supplement to the first volume on Hydromedusae. Cambridge University Press, London.
- Sabatés A., Pagés F., Atienza D., Fuentes V., Purcell J.E., Gili J.M. 2010. Planktonic cnidarian distribution and feeding of *Pelagia noctiluca* in the NW Mediterranean Sea. *Hydrobiologia* 645: 153-165.
- Sambrook J., Russell D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schlötterer C., Tautz D. 1994. Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution. *Current Biology* 4: 777-783.
- Schmidt R. 1993. Environmental changes in two Adriatic coastal lakes in the time interval 7.500 – 5.000 B.P. (Atlantic) with special reference to the diatom succession of *Cyclotella*. *Limnologia* 23: 47-58.
- Schneider G., Behrends G. 1994. Population dynamics and the trophic role of *Aurelia aurita* in the Kiel Bight and western Baltic. *ICES Journal of Marine Sciences* 51: 359-367.
- Schroth W., Jarms G., Streit B., Schierwater B. 2002. Speciation and phylogeography in the cosmopolitan marine moon jelly, *Aurelia* sp. *BMC Evolutionary Biology* 2: 1-10.
- Seutin G., White B.N., Boag P.T. 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69: 82-90.
- Shao Z., Graf S., Chaga O.Y., Lavrov D.V. 2006. Mitochondrial genome of the moon jelly *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa): A linear DNA molecule encoding a putative DNA-dependent DNA polymerase. *Gene* 381: 92-101.
- Shearer T.L., van Oppen M.J.H., Romano S.L., Wörheide G. 2002. Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Ecology* 11: 2475-2487.
- Shearer T.L., Coffroth M.A. 2008. Barcoding corals: limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. *Molecular Ecology Resources* 8: 247-255.
- Somero G.N. 2002. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integrative Comparative Biology* 42: 780-789.
- Sorokin Y.I. 2002. The Black Sea: Ecology and Oceanography. Backhuys, Leiden.
- Stopar K., Ramšak A., Trontelj P., Malej A. 2010. Lack of genetic structure in the jellyfish *Pelagia noctiluca* (Cnidaria: Scyphozoa: Semaestomeae) across European seas. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57(1): 417-428.
- Stopar K., Ramšak A., Malej A. 2011. Comparative phylogeography of meroplanktonic scyphozoan species (*Aurelia* spp. and *Rhizostoma pulmo*) in European Seas. *Hydrobiologia* (v recenziji).

- Straehler-Pohl I., Jarms G. 2010. Identification key for young ephyrae: a first step for early detection of jellyfish blooms. *Hydrobiologia* 645: 3-21.
- Sugiura Y. 1965. On the life-history of rhizostome medusae. III. On the effects of temperature on the strobilation of *Mastigias papua*. *Biological Bulletin* 128: 493-496.
- Sugiura Y. 1966. On the life-history of rhizostome medusae IV. *Cephea cephea*. *Embryologia* 9: 105-122.
- Swofford D.L., Sullivan J. 2003. Phylogeny inference based on parsimony and other methods using PAUP*. V: Salemi E., Vandamme A.M. (ur.) *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. Cambridge University Press, str. 160-206.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura K., Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (v tisku).
- Templeton A.R., Crandall K.A., Sing C.F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-633.
- Thiede J. 1978. A glacial Mediterranean. *Nature* 276: 680-683.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research* 25(24): 4876-4882.
- UNEP 1991. Jellyfish Blooms in the Mediterranean. Proceedings of II Workshop on Jellyfish in the Mediterranean Sea. Mediterranean Action Plan Technical Reports Series 47, 320 str.
- Uye S.I., Fujii N., Takeoka H. 2003. Unusual aggregations of the scyphomedusa *Aurelia aurita* in coastal waters along western Shikoku, Japan. *Plankton Biology and Ecology* 50(1): 17-21.
- 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.
- Vladymyrov V., Kideys A.E., Myroshnychenko V., Slipetsky D., Shiganova T., Abolmasova G., Binge F., Tezcan D., Ak Y., Anninsky B., Bat L., Finenko G., Gorbunov V., Isinibilir M., Kamburska L., Mihneva V., Ozdemir Z.B., Romanova Z., Sergeyeva O., Stefanova K., Xalvashi M. 2011. A basin-wide Black Sea *Mnemiopsis leidyi* database. *Aquatic Invasions* 6(1): 115-122.
- Waggoner B., Collins A.G. 2004. *Reductio ad absurdum*: Testing the evolutionary relationships of Ediacaran and paleozoic problematic fossils using molecular divergence dates. *Journal of Paleontology* 78(1): 51-61.
- Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for sample extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4): 506-513.

- Wares J.P., Cunningham C.W. 2001. Phylogeography and Historical Ecology of the North Atlantic Intertidal. *Evolution* 55(12): 2455-2469.
- Whelan S., Liò P., Goldman N. 2001. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *TRENDS in Genetics* 17(5): 262-272.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: Innis M.A., Gelfand G.H., Sninsky J.J., White T.J. (ur.) *PCR Protocols*. Academic Press, San Diego, str. 315-332.
- Winnepenninckx B., Backeljau T., De Wachter R. 1993. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics* 9: 407.
- Xia X., Xie Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92: 371-373.
- Xia X., Xie Z., Salemi M., Chen L., Wang Y. 2003. An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 1-7.
- Xian W., Kang B., Liu R. 2005. Jellyfish Blooms in the Yangtze Estuary. *Science* 307: 41.
- Yang Z. 1994. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *Journal of Molecular Evolution* 39: 306-314.
- Zakšek V., Sket B., Trontelj P., 2007. Phylogeny of the cave shrimp *Troglocaris*: Evidence of a young connection between Balkans and Caucasus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 223-235.
- Zavodnik D. 1991. On the food and feeding in the northern Adriatic of *Pelagia noctiluca* (Scyphozoa), V: UNEP Jellyfish Blooms in the Mediterranean, Proc. II Workshop of Jellyfish Blooms in the Mediterranean Sea, Mediterranean Action Plan Technical Reports Series, Athens 47: 212-216.
- Zhang D.X., Hewitt G.M. 2003. Nuclear DNA analysis in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12: 563-584.
- Zore-Armanda M., Bone M., Dadić V., Morović M., Ratković D., Stojanovski L., Vukadin I. 1991. Hydrographic properties of the Adriatic Sea. *Acta Adriatica* 32: 5-540.

ZAHVALA

Čisto naravno in tako življenjsko je, da vedno pač ne gre vse tako, kot si želiš in še posebej takrat hrepeniš po podpori, razumevanju, vzpodbudi,... Nikakor pa ni samoumevno, da ravno ko najbolj potrebuješ pomoč, to tudi prejmeš in to še v večji meri, kot jo v osnovi potrebuješ. Tako bi se pristrčno rada zahvalila vsem, ki ste mi vztrajno stali ob strani na pot do tega življenjskega dosežka. Ni jih malo in žal prav verjetno vseh ne bom uspela našteti, zato najprej za vse en velik HVALA.

Vseeno pa bi se posebej toplo zahvalila mentorici doc. dr. Andreji Ramšak, ki mi je ponudila to priložnost, mi zaupala in pomagala, me vzpodbujala in usmerjala proti tako željenemu cilju. Vsekakor pa bi vse skupaj praktično bilo neizvedljivo brez velike naklonjenosti, razumevanja in podpore prof. dr. Alenke Malej, ki je ustvarila pogoje, da skupina za raziskave meduz na NIB - Morski biološki postaji Piran lahko deluje.

Hvala prof. dr. Petru Dovču in prof. dr. Petru Trontlju za pregled doktorske disertacije. Prof. dr. Petru Trontlju še posebej velika zahvala za dragocene nasvete in pomoč pri uvajanju v filogeografske analize.

Hvala vsem, ki ste mi kakor koli pomagali pri vzorčenju, sploh pa neutrudni in izjemni cimri Tjaši, ki je bila vedno pripravljena na akcijo, me brezpogojno podpirala in je še tako naporno in dolgotrajno vzorčenje znala narediti zabavno in luštno.

Iskrena hvala vsem raziskovalcem, ki so donirali vzorce tkiv meduz: Dror Angel (Izrael), Diana Astorga Garcia & Laura Prieto (Španija), Adam Benović & Vlado Onofri (Hrvaška), Tom Doyle (Irska), Gabriel Gorsky (Francija), Mateja Grego & Tihomir Makovec & Janez Forte (Slovenija), Reinhold Hanel (Nemčija), Manuela Krakau (Nemčija), Bojan Marčeta (Slovenija), Hermes Mianzan (Argentina), Mohamed Néjib Daly Yahia (Tunizija), Tamara A. Shiganova (Rusija), Adriana Vella (Malta), Maciej Wołowicz & Michal Olenycz (Poljska), Joana Xavier (Azori, Portugalska).

Hvala Tinkari in Jani za nasvete in pomoč v laboratoriju, pa dragi Almi za tisoč in eno malenkost, brez katere pa delo ne bi potekalo tekoče. Hvala tudi vsem ostalim MBP-jevcem, ki ste me močno vzpodbujali in podpirali. Prav vsem članicam in članom MR društva MBP pa velika zahvala za motivacijo in inspiracijo, pa enostavno se vsega ne da izraziti z besedami...

Posebno zahvalo za zvesto podporo in potrpljenje pa želim izraziti mojim domačim. Pristrčna hvala mami in tatu ter bratoma z družinama za prijetno in varno zavetje. Dragi Samo brez tebe pa bi vse bilo neskončno težje in življenje brez pravega cilja in smisla. Iskrena ti hvala za tehnično pomoč, ljubečo podporo in optimizem.

PRILOGE

Priloga A: Seznam osebkov klobučnjaških meduz glede na mesto vzorčevanja in haplotipov s pripadajočo kodo iz zbirke GenBank.

Appendix A: List of scyphozoan specimens according to sampling localities and haplotypes with corresponding GenBank Accession Number.

VRSTA	ID OSEBKA	GEOGRAFSKO OBMOČJE	OZNAKA HAPLOTIPA / KODA V ZBIRKI GENBANK				
			COI	ITS1	ITS2	COI/ITS1/ITS2	ITS1/ITS2
<i>Aurelia aurita</i>	AA0713	Severno morje ¹	/	AA1_01 HQ913992	AA0713 HQ913957	/	AA0713
	AA0736	Severno morje ¹	AA_CO1 HQ913913	/	/	/	/
	AX0703	Črno morje ²	AA_CO2 HQ913945	/	/	/	/
	AX0801	Črno morje ²	AA_CO2 HQ913946	AA1_02 HQ914019	AA2_04 HQ913986	AX0801	AX0801
	AX0805	Črno morje ²	AA_CO2 HQ913947	/	/	/	/
	AX0807	Črno morje ²	AA_CO2 HQ913948	AA1_02 HQ914020	AX0807 HQ913987	AA_MIX1	AX0807
	AX0808	Črno morje ²	AA_CO2 HQ913949	AA1_02 HQ914021	AA2_02 HQ913988	AA_MIX1	AA_IT01
	AX0809	Črno morje ²	AA_CO2 HQ913950	AA1_02 HQ914022	AA2_02 HQ913989	AA_MIX1	AA_IT01
	AX0810	Črno morje ²	AA_CO2 HQ913951	AA1_02 HQ914023	/	/	/
	AX0811	Črno morje ²	AX0811 HQ913956	AA1_02 HQ914024	/	/	/
	AA0801	Baltsko morje ³	AA_CO1 HQ913914	AA1_02 HQ913993	/	/	/
	AA0802	Baltsko morje ³	AA_CO1 HQ913915	AA1_01 HQ913994	AA2_01 HQ913958	AA0802	AA_IT03
	AA0803	Baltsko morje ³	AA0803 HQ913916	AA1_01 HQ913995	AA2_01 HQ913959	AA0803	AA_IT03
	AA0808	Baltsko morje ³	/	AA1_01 HQ913996	AA2_01 HQ913960	/	AA_IT03
	AA0809	Baltsko morje ³	/	/	AA2_01 HQ913961	/	/
	AA0810	Baltsko morje ³	AA_CO1 HQ913917	AA1_01 HQ913997	/	/	/
	AA1203	Črno morje ⁴	AA_CO2 HQ913918	AA1_02 HQ913998	/	/	/
	AA1204	Črno morje ⁴	AA_CO2 HQ913919	/	/	/	/
	AA1205	Črno morje ⁴	AA_CO2 HQ913920	/	AA2_02 HQ913962	/	/
	AA1213	Črno morje ⁴	AA_CO2 HQ913921	/	/	/	/
	AA1220	Črno morje ⁴	AA1220 HQ913922	/	AA1220 HQ913963	/	/
	AA1224	Črno morje ⁴	AA_CO2 HQ913923	/	AA2_02 HQ913964	/	/
	AA1225	Črno morje ⁴	AA1225 HQ913924	/	AA2_02 HQ913965	/	/
	AA1231	Črno morje ⁴	/	AA1_02 HQ913999	AA2_02 HQ913966	/	AA_IT01

VRSTA	ID OSEBKA	GEOGRAFSKO OBMOČJE	OZNAKA HAPLOTIPA / KODA V ZBIRKI GENBANK				
<i>Aurelia aurita</i>	AX1901	Severno morje ⁵	AX1901 HQ913952	/	/	/	/
	AX1902	Severno morje ⁵	AA_CO1 HQ913953	AX1902 HQ914025	AA2_02 HQ913990	AX1902	AX1902
	AX1903	Severno morje ⁵	AX1903 HQ913954	AA1_02 HQ914026	/	/	/
	AX1904	Severno morje ⁵	AA_CO2 HQ913955	AA1_02 HQ914027	AX1904 HQ913991	AX1904	AX1904
	AA2709	Črno morje ⁶	AA2709 HQ913940	/	/	/	/
	AA2711	Črno morje ⁶	AA2711 HQ913941	AA1_02 HQ914015	AA2711 HQ913982	AA2711	AA2711
	AA2714	Črno morje ⁶	AA_CO6 HQ913942	AA1_02 HQ914016	AA2714 HQ913983	AA2714	AA2714
	AA2721	Črno morje ⁶	AA2721 HQ913943	AA2721 HQ914017	AA2_05 HQ913984	AA2721	AA2721
	AA2722	Črno morje ⁶	AA_CO2 HQ913944	AA1_02 HQ914018	AA2722 HQ913985	AA2722	AA2722
	AA_GUL	Severno morje, Gullmar fjord	AA_GUL AY903118	AA_GUL AY935206	AA_GUL AY935206	AA_GUL	AA_GUL
	AA_AN1	severovzhodni Atlantik, Wales	AA_AN1 AY903208	/	/	/	/
	AA_AN2	severovzhodni Atlantik, Wales	AA_CO7 AY903209	/	/	/	/
	AA_AN3	severovzhodni Atlantik, Wales	AA_AN3 AY903210	/	/	/	/
	AA_AN4	severovzhodni Atlantik, Wales	AA_CO7 AY903211	/	/	/	/
	AA_AN5	severovzhodni Atlantik, Wales	AA_AN5 AY903212	/	/	/	/
	AA_BOS	Bospor, Črno morje	AA_BOS AY903117	/	/	/	/
	AA_RIS	severozahodni Atlantik	/	AA_RIS AY935205	AA_RIS AY935205	/	AA_RIS
	AA_BH1	severozahodni Atlantik	AA_BH1 AY903093	/	/	/	/
	AA_BH2	Severozahodni Atlantik	AA_BH2 AY903094	/	/	/	/
	AA_BH3	severozahodni Atlantik	AA_BH3 AY903095	/	/	/	/
<i>Aurelia</i> sp. 1	AU_1EP	severovzhodni Tihi ocean	AU_1EP AY903186	AU_1EP AY935203	AU_1EP AY935203	AU_1EP	AU_1EP
	AU_1WP	severozahodni Tihi ocean	AU_1WP AY903091	AU_1WP AY935214	AU_1WP AY935214	AU_1WP	AU_1WP
<i>Aurelia</i> sp. 2	AUsp02	jugozahodni Atlantik, Brazilija	AUsp02 AY903122	AUsp02 AY935204	AUsp02 AY935204	AUsp02	AUsp02
<i>Aurelia</i> sp. 3	AUsp03	jezera Palau, Tihi ocean	AUsp03 AY903115	AUsp03 AY935209	AUsp03 AY935209	AUsp03	AUsp03
<i>Aurelia</i> sp. 4	AUsp04	jezera Palau, Tihi ocean	AUsp04 AY903136	AUsp04 AY935208	AUsp04 AY935208	AUsp04	AUsp04
<i>Aurelia</i> sp. 5	AU_ML1	Mljet, Jadransko morje	AA_ML1 AY903123	AA_ML1 AY935210	AA_ML1 AY935210	AA_ML1	AA_ML1
	AU_ML2	Mljet, Jadransko morje	AA_ML2 AY903124	/	/	/	/
	AU_ML3	Mljet, Jadransko morje	AA_CO6 AY903125	/	/	/	/
	AA2201	Mljet, Jadransko morje ⁷	AA_CO5 HQ913934	AA2201 HQ914009	AA2201 HQ913976	AA2201	AA2201
	AA2202	Mljet, Jadransko morje ⁷	AA_CO5 HQ913935	AA2202 HQ914010	AA2_05 HQ913977	AA2202	AA2202
	AA2204	Mljet, Jadransko morje ⁷	AA_CO5 HQ913936	AA2204 HQ914011	AA2204 HQ913978	AA2204	AA2204

VRSTA	ID OSEBKA	GEOGRAFSKO OBMOČJE	OZNAKA HAPLOTIPA / KODA V ZBIRKI GENBANK				
<i>Aurelia</i> sp. 5	AA2205	Mljet, Jadransko morje ⁷	AA2205 HQ913937	AA2205 HQ914012	AA2_05 HQ913979	AA2205	AA2205
	AA2210	Mljet, Jadransko morje ⁷	AA_CO2 HQ913938	AA2210 HQ914013	AA2_04 HQ913980	AA2210	AA2210
	AA2501	jugozahodni Atlantik, Argentina	AA2501 HQ913939	AA2501 HQ914014	AA2501 HQ913981	AA2501	AA2501
<i>Aurelia</i> sp. 6	AUsp06	jezera Palau, Tihi ocean	AUsp06 AY903129	AUsp06 AY935207	AUsp06 AY935207	AUsp06	AUsp06
<i>Aurelia</i> sp. 7	AUsp07	južni Tihi ocean, Tasmanija	AUsp07 AY903141	AUsp07 AY935217	AUsp07 AY935217	AUsp07	AUsp07
<i>Aurelia</i> sp. 8	AU_NA1	Tržaški zaliv, severni Jadran	AU_NA1 AY903132	/	/	/	/
	AU_NA2	Tržaški zaliv, severni Jadran	AU_NA2 AY903133	AU_NA2 AY935212	AU_NA2 AY935212	AU_NA2	AU_NA2
	AU_SA1	južni Jadran, Ston	AU_CO8 AY903134	AU_SA1 AY935213	AU_SA1 AY935213	AU_SA1	AU_SA1
	AU_SA2	južni Jadran, Ston	AU_CO8 AY903135	/	/	/	/
	AA1701	severni Jadran ⁸	AA_CO3 HQ913925	/	AA2_03 HQ913967	/	/
	AA1702	severni Jadran ⁸	AA_CO3 HQ913926	/	AA2_03 HQ913968	/	/
	AA1703	severni Jadran ⁸	AA_CO4 HQ913927	AA1_03 HQ914000	AA2_03 HQ913969	AA_MIX2	AA_IT02
	AA1704	severni Jadran ⁸	AA_CO4 HQ913928	AA1_03 HQ914001	AA2_03 HQ913970	AA_MIX2	AA_IT02
	AA1705	severni Jadran ⁸	AA_CO3 HQ913929	AA1_03 HQ914002	AA2_03 HQ913971	AA1705	AA_IT02
	AA1706	severni Jadran ⁸	AA_CO3 HQ913930	AA1_04 HQ914003	/	/	/
	AA1707	severni Jadran ⁸	AA_CO4 HQ913931	AA1_03 HQ914004	/	/	/
	AA1711	severni Jadran ⁸	AA_CO3 HQ913932	AA1_03 HQ914005	AA1711 HQ913972	AA1711	AA1711
	AA1712	severni Jadran ⁸	AA_CO3 HQ913933	AA1_04 HQ914006	AA1712 HQ913973	AA1712	AA1712
	AA1725	severni Jadran ⁸	/	AA1_03 HQ914007	AA2_03 HQ913974	/	AA_IT02
	AA1731	severni Jadran ⁸	/	AA1_03 HQ914008	AA2_03 HQ913975	/	AA_IT02
<i>Aurelia</i> sp. 9	AUsp09	zahodni Atlantik, Mehiški zaliv	AUsp09 AY903172	AUsp09 AY935216	AUsp09 AY935216	AUsp09	AUsp09
<i>Aurelia</i> sp. 10	AUsp10	severni Tihi ocean	AUsp10 AY903067	AUsp10 AY935211	AUsp10 AY935211	AUsp10	AUsp10
<i>Aurelia</i> sp. 11	AUsp11	Tihi ocean	AUsp11 AY903213	/	/	/	/
<i>Aurelia limbata</i>	AU_LIM	severozahodni Tihi ocean	AU_LIM AY903189	AU_LIM AY935215	AU_LIM AY935215	AU_LIM	AU_LIM
<i>Aurelia labiata</i>	AU_LAB	severovzhodni Tihi ocean	AU_LAB AY903073	AU_LAB AY935202	AU_LAB AY935202	AU_LAB	AU_LAB
<i>Pelagia noctiluca</i>	PEL_NO	zunanja skupina	PEL_NO GQ376005	PEL_NO GQ368916	PEL_NO GQ383937	PEL_NO	PEL_NO
<i>Cyanea capillata</i>	CYA_CA	zunanja skupina	CYA_CA AY902911	CYA_CA U65481	CYA_CA U65481	CYA_CA	CYA_CA
<i>Pelagia noctiluca</i>	PN0601	zahodno Sredozemlje ⁹	PN0601 GQ375903	PN1_01 GQ368906	PN2_02 GQ383926	PN0601	PN_IT11
	PN0602	zahodno Sredozemlje ⁹	PN0602 GQ375904	PN1_05 GQ368907	PN2_03 GQ383927	PN0602	PN_IT02
	PN0603	zahodno Sredozemlje ⁹	PN_CO6 GQ375905	PN1_01 GQ368908	PN2_02 GQ383928	PN_MIX1	PN_IT11
	PN0604	zahodno Sredozemlje ⁹	PN0604 GQ375906	PN1_01 GQ368909	PN2_02 GQ383929	PN0604	PN_IT11

VRSTA	ID OSEBKA	GEOGRAFSKO OBMOČJE	OZNAKA HAPLOTIPA / KODA V ZBIRKI GENBANK				
<i>Pelagia noctiluca</i>	PN0606	zahodno Sredozemlje ⁹	PN0606 GQ375907	PN0606 GQ368910	PN2_01 GQ383930	PN0606	PN_IT04
	PN0607	zahodno Sredozemlje ⁹	PN_CO4 GQ375908	PN1_01 GQ368911	PN2_02 GQ383931	PN_MIX3	PN_IT11
	PN0608	zahodno Sredozemlje ⁹	PN0608 GQ375909	PN1_03 GQ368912	PN2_02 GQ383932	PN0608	PN_IT01
	PN0609	zahodno Sredozemlje ⁹	PN_CO4 GQ375910	PN1_06 GQ368913	PN2_10 GQ383933	PN0609	PN0609
	PN0610	zahodno Sredozemlje ⁹	PN0610 GQ375911	/	/	/	/
	PN0611	zahodno Sredozemlje ⁹	PN0611 GQ375912	/	PN2_02 GQ383934	/	/
	PN0612	zahodno Sredozemlje ⁹	PN0612 GQ375913	/	/	/	/
	PN0613	zahodno Sredozemlje ⁹	PN0613 GQ375914	PN1_03 GQ368914	PN2_02 GQ383935	PN0613	PN_IT01
	PN0801	južni Jadran ¹⁰	PN_CO1 GQ376003	PN1_01 GQ368915	PN2_02 GQ384036	PN0801	PN_IT11
	PN0802	južni Jadran ¹⁰	PN0802 GQ376004	/	/	/	/
	PN0803	južni Jadran ¹⁰	PN_CO4 GQ376005	PN1_01 GQ368916	PN2_02 GQ383937	PN_MIX3	PN_IT11
	PN0804	južni Jadran ¹⁰	PN0804 GQ376006	PN1_01 GQ368917	PN2_07 GQ383938	PN0804	PN_IT05
	PN0805	južni Jadran ¹⁰	PN0805 GQ376007	PN1_01 GQ368918	PN2_02 GQ383939	PN0805	PN_IT11
	PN0806	južni Jadran ¹⁰	PN_CO7 GQ376008	PN1_01 GQ368919	PN2_06 GQ383940	PN0806	PN_IT06
	PN0807	južni Jadran ¹⁰	PN0807 GQ376009	PN1_01 GQ368920	PN2_02 GQ383941	PN0807	PN_IT11
	PN0808	južni Jadran ¹⁰	PN0808 GQ376010	/	PN2_05 GQ383942	/	/
	PN0809	južni Jadran ¹⁰	PN0809 GQ376011	/	PN2_01 GQ383943	/	/
	PN0810	južni Jadran ¹⁰	PN0810 GQ376012	/	/	/	/
	PN0811	južni Jadran ¹⁰	PN_CO4 GQ376013	/	/	/	/
	PN0812	južni Jadran ¹⁰	PN0812 GQ376014	/	/	/	/
	PN0813	južni Jadran ¹⁰	PN0813 GQ376015	/	/	/	/
	PN0814	južni Jadran ¹⁰	PN0814 GQ376016	/	/	/	/
	PN0815	južni Jadran ¹⁰	PN0815 GQ376017	/	/	/	/
	PN0816	južni Jadran ¹⁰	PN_CO1 GQ376018	/	/	/	/
	PN0901	južni Jadran ¹¹	PN_CO4 GQ376019	PN1_02 GQ368921	PN2_01 GQ383944	PN0901	PN_IT04
	PN0902	južni Jadran ¹¹	PN0902 GQ376020	PN1_01 GQ368922	PN0902 GQ383945	PN0902	PN0902
	PN0903	južni Jadran ¹¹	PN_CO2 GQ376021	PN0903 GQ368923	PN2_04 GQ383946	PN0903	PN_IT08
	PN1001	severni Jadran ¹²	PN1001 GQ375915	PN1_01 GQ368924	PN2_02 GQ383947	PN1001	PN_IT11
	PN1002	severni Jadran ¹²	PN1002 GQ375916	PN1_01 GQ368925	PN2_08 GQ383948	PN1002	PN_IT10
	PN1003	severni Jadran ¹²	PN_CO1 GQ375917	PN1_01 GQ368926	PN2_06 GQ383949	PN1003	PN_IT06
PN1004	severni Jadran ¹²	PN1004 GQ375918	PN1_01 GQ368927	PN2_07 GQ383950	PN1004	PN_IT05	
PN1005	severni Jadran ¹²	PN1005 GQ375919	PN1_01 GQ368928	PN1005 GQ383951	PN1005	PN1005	

VRSTA	ID OSEBKA	GEOGRAFSKO OBMOČJE	OZNAKA HAPLOTIPA / KODA V ZBIRKI GENBANK				
<i>Pelagia noctiluca</i>	PN1006	severni Jadran ¹²	PN_CO8 GQ375920	PN1_02 GQ368929	PN2_01 GQ383952	PN1006	PN_IT04
	PN1007	severni Jadran ¹²	PN1007 GQ375921	PN1_01 GQ368930	PN2_02 GQ383953	PN1007	PN_IT11
	PN1008	severni Jadran ¹²	PN1008 GQ375922	PN1_01 GQ368931	PN2_01 GQ383954	PN1008	PN_IT07
	PN1009	severni Jadran ¹²	PN_CO6 GQ375923	/	PN2_02 GQ383955	/	/
	PN1010	severni Jadran ¹²	PN1010 GQ375924	PN1_02 GQ368932	PN2_01 GQ383956	PN1010	PN_IT04
	PN1101	severni Jadran ¹³	PN1101 GQ375925	PN1_01 GQ368933	PN1101 GQ383957	PN1101	PN1101
	PN1102	severni Jadran ¹³	PN1102 GQ375926	PN1_01 GQ368934	PN2_02 GQ383958	PN1102	PN_IT11
	PN1103	severni Jadran ¹³	PN_CO4 GQ375927	PN1_01 GQ368935	PN2_01 GQ383959	PN_MIX2	PN_IT07
	PN1104	severni Jadran ¹³	PN_CO4 GQ375928	PN1_01 GQ368936	/	/	/
	PN1105	severni Jadran ¹³	PN_CO4 GQ375929	PN1_05 GQ368937	PN2_03 GQ383960	PN1105	PN_IT02
	PN1106	severni Jadran ¹³	PN_CO1 GQ375930	/	/	/	/
	PN1107	severni Jadran ¹³	PN_CO4 GQ375931	PN1_01 GQ368938	PN2_01 GQ383961	PN_MIX2	PN_IT07
	PN1301	zahodno Sredozemlje ¹⁴	PN_CO4 GQ375932	PN1_01 GQ368940	PN2_02 GQ383963	PN_MIX3	PN_IT11
	PN1302	zahodno Sredozemlje ¹⁴	PN_CO4 GQ375933	PN1_01 GQ368942	PN2_05 GQ384064	PN1302	PN1302
	PN1303	zahodno Sredozemlje ¹⁴	PN1303 GQ375934	PN1_02 GQ368942	PN2_01 GQ383965	PN1303	PN_IT04
	PN1305	zahodno Sredozemlje ¹⁴	PN1305 GQ375935	PN1305 GQ368943	PN1305 GQ383966	PN1305	PN1305
	PN1306	zahodno Sredozemlje ¹⁴	PN1306 GQ375936	/	/	/	/
	PN1307	zahodno Sredozemlje ¹⁴	PN_CO2 GQ375937	PN1_03 GQ368944	PN2_02 GQ383967	PN1307	PN_IT01
	PN1308	zahodno Sredozemlje ¹⁴	PN1308 GQ375938	PN1_01 GQ368945	PN2_02 GQ383968	PN1308	PN_IT11
	PN1309	zahodno Sredozemlje ¹⁴	PN_CO4 GQ375939	/	PN2_01 GQ383969	/	/
	PN1401	severni Jadran ¹⁵	PN1401 GQ375940	PN1_01 GQ368946	PN2_10 GQ383970	PN1401	PN_IT03
	PN1402	severni Jadran ¹⁵	PN_CO4 GQ375941	PN1_04 GQ368947	PN2_09 GQ383971	PN1402	PN_IT09
	PN1403	severni Jadran ¹⁵	PN1403 GQ375942	/	/	/	/
	PN1404	severni Jadran ¹⁵	PN1404 GQ375943	PN1_01 GQ368948	PN2_02 GQ383972	PN1404	PN_IT11
	PN1405	severni Jadran ¹⁵	PN_CO4 GQ375944	/	/	/	/
	PN1406	severni Jadran ¹⁵	PN_CO5 GQ375945	PN1_01 GQ368949	PN2_01 GQ383973	PN1406	PN_IT07
	PN1501	severni Jadran ¹⁵	PN1501 GQ375946	PN1_01 GQ368950	PN2_07 GQ383974	PN1501	PN_IT05
	PN1502	severni Jadran ¹⁵	PN1502 GQ375947	PN1_01 GQ368951	PN2_02 GQ383975	PN1502	PN_IT11
	PN1503	severni Jadran ¹⁵	PN1503 GQ375948	PN1_01 GQ368953	PN2_01 GQ383976	PN1503	PN_IT07
	PN1504	severni Jadran ¹⁵	PN_CO4 GQ375949	PN1_01 GQ368953	PN2_01 GQ383977	PN_MIX2	PN_IT07
PN1505	severni Jadran ¹⁵	PN_CO4 GQ375950	PN1_01 GQ368954	PN2_02 GQ383978	PN_MIX3	PN_IT11	
PN1506	severni Jadran ¹⁵	PN1506 GQ375951	PN1_01 GQ368955	PN2_01 GQ383979	PN1506	PN_IT07	

VRSTA	ID OSEBKA	GEOGRAFSKO OBMOČJE	OZNAKA HAPLOTIPA / KODA V ZBIRKI GENBANK				
<i>Pelagia noctiluca</i>	PN1507	severni Jadran ¹⁵	PN1507 GQ375952	PN1_01 GQ368956	PN2_02 GQ383980	PN1507	PN_IT11
	PN1508	severni Jadran ¹⁵	PN1508 GQ375953	PN1_01 GQ368957	PN2_02 GQ383981	PN1508	PN_IT11
	PN1601	severni Jadran ¹⁵	PN1601 GQ375954	PN1_01 GQ368958	PN2_08 GQ383982	PN1601	PN_IT09
	PN1602	Severni Jadran ¹⁵	PN1602 GQ375955	PN1602 GQ368959	PN2_01 GQ383983	PN1602	PN1602
	PN1603	severni Jadran ¹⁵	PN1603 GQ375956	PN1_02 GQ368960	PN2_01 GQ383984	PN1603	PN_IT04
	PN1604	severni Jadran ¹⁵	PN1604 GQ375957	PN1_01 GQ368961	PN2_02 GQ383985	PN1604	PN_IT11
	PN1605	severni Jadran ¹⁵	PN1605 GQ375958	/	/	/	/
	PN1701	severni Jadran ¹⁶	PN1701 GQ375959	PN1701 GQ368962	PN2_02 GQ383986	PN1701	PN1701
	PN1702	severni Jadran ¹⁶	PN1702 GQ375960	PN1_01 GQ368963	PN2_02 GQ383987	PN1702	PN_IT11
	PN1703	severni Jadran ¹⁶	PN_CO3 GQ375961	PN1_01 GQ368964	PN2_09 GQ383988	PN1703	PN_IT09
	PN1704	severni Jadran ¹⁶	PN1704 GQ375962	PN1_03 GQ368965	PN2_02 GQ383989	PN1704	PN_IT01
	PN1802	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN1802 GQ375963	PN1802 GQ368966	PN2_04 GQ383990	PN1802	PN1802
	PN1803	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN_CO4 GQ375964	PN1_01 GQ368967	PN2_01 GQ383991	PN_MIX2	PN_IT07
	PN1804	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN_CO4 GQ375965	PN1_04 GQ368968	PN2_01 GQ383992	PN1804	PN1804
	PN1805	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN1805 GQ375966	/	PN2_02 GQ383993	/	/
	PN1806	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN1806 GQ375967	/	PN2_02 GQ383994	/	/
	PN1809	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN_CO4 GQ375968	/	PN1809 GQ383995	/	/
	PN1810	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN_CO4 GQ375969	/	PN2_02 GQ383996	/	/
	PN1811	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	/	PN1_02 GQ368969	PN2_01 GQ383997	/	PN_IT04
	PN1812	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN1812 GQ375970	PN1_01 GQ368970	PN2_02 GQ383998	PN1812	PN_IT11
	PN1813	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN1813 GQ375971	/	PN2_01 GQ383999	/	/
	PN1814	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN_CO4 GQ375972	PN1_01 GQ368971	PN2_02 GQ384000	PN_MIX3	PN_IT11
	PN1815	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN1815 GQ375973	PN1_01 GQ368972	PN2_02 GQ384001	PN1815	PN_IT11
	PN1818	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN1818 GQ375974	PN1_01 GQ368973	PN2_02 GQ384002	PN1818	PN_IT11
	PN1819	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN_CO5 GQ375975	PN1_01 GQ368974	PN2_02 GQ384003	PN1819	PN_IT11
	PN1820	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN_CO6 GQ375976	/	PN2_01 GQ384004	/	/
	PN1822	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN_CO7 GQ375977	PN1_01 GQ368975	PN2_02 GQ384005	PN1822	PN_IT11
	PN1825	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN1825 GQ375978	PN1_02 GQ368977	PN2_01 GQ384007	PN1825	PN_IT04
	PN1826	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN1826 GQ375979	PN1_01 GQ368979	PN2_02 GQ384008	PN1826	PN_IT11
	PN1827	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN1827 GQ375980	PN1_02 GQ368978	PN2_01 GQ384009	PN1827	PN_IT04
PN1828	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN1828 GQ375981	PN1_01 GQ368980	PN2_02 GQ384010	PN1828	PN_IT11	
PN1829	vzhodni Atlantik, Azori ¹⁷	PN1829 GQ375982	PN1_01 GQ368981	PN1829 GQ384011	PN1829	PN1829	

VRSTA	ID OSEBKA	GEOGRAFSKO OBMOČJE	OZNAKA HAPLOTIPA / KODA V ZBIRKI GENBANK				
<i>Pelagia noctiluca</i>	PN2001	severovzhodni Atlantik ¹⁸	/	PN1_01 GQ368983	PN2_04 GQ384012	/	PN_IT08
	PN2002	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN2002 GQ375983	PN1_01 GQ368984	PN2_01 GQ384013	PN2002	PN_IT07
	PN2003	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN2003 GQ375984	PN1_01 GQ368985	PN2_01 GQ384014	PN2003	PN_IT07
	PN2004	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN2004 GQ375985	PN1_01 GQ368986	PN2_02 GQ384015	PN2004	PN_IT11
	PN2005	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN2005 GQ375986	PN1_03 GQ368987	PN2_02 GQ384016	PN2005	PN_IT01
	PN2006	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN2006 GQ375987	PN1_01 GQ368988	PN2006 GQ384017	PN2006	PN2006
	PN2007	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN2007 GQ375988	PN1_02 GQ368989	PN2_01 GQ384018	PN2007	PN_IT07
	PN2008	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN2008 GQ375989	PN1_02 GQ368990	PN2008 GQ384019	PN2008	PN2008
	PN2009	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN2009 GQ375990	/	/	/	/
	PN2011	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN_CO8 GQ375991	PN2011 GQ368991	PN2011 GQ384020	PN2011	PN2011
	PN2012	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN2012 GQ375992	PN1_01 GQ368992	PN2012 GQ384021	PN2012	PN2012
	PN2013	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN_CO9 GQ375993	PN1_02 GQ368993	PN2013 GQ384022	PN2013	PN2013
	PN2014	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN2014 GQ375994	PN1_01 GQ368994	PN2_02 GQ384023	PN2014	PN_IT11
	PN2015	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN2015 GQ375995	PN1_01 GQ368995	PN2_02 GQ384024	PN2015	PN_IT11
	PN2016	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN_CO9 GQ375996	PN1_01 GQ368996	PN2_02 GQ384025	PN2016	PN_IT11
	PN2017	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN2017 GQ375997	PN1_01 GQ368997	PN2_10 GQ384026	PN2017	PN_IT03
	PN2018	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN2018 GQ375998	PN1_01 GQ368998	PN2_02 GQ384027	PN2018	PN_IT11
	PN2019	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN2019 GQ375999	PN1_01 GQ368999	PN2_02 GQ384028	PN2019	PN_IT11
	PN2020	severovzhodni Atlantik ¹⁸	PN2020 GQ376000	PN1_01 GQ369000	PN2_07 GQ384029	PN2020	PN_IT05
	PN2101	Alboransko morje ¹⁹	PN2101 GQ376001	PN1_01 GQ369001	PN2_02 GQ384030	PN2101	PN_IT11
	PN2102	Alboransko morje ¹⁹	PN2102 GQ376002	PN1_01 GQ369002	PN2_01 GQ384031	PN2102	PN_IT07
	PN2201	južni Jadran ²⁰	PN2201 GQ376022	PN1_06 GQ369003	PN2_01 GQ384032	PN2201	PN2201
	PN2202	južni Jadran ²⁰	PN_CO4 GQ376023	PN1_01 GQ369004	PN2_02 GQ384033	PN_MIX3	PN_IT11
	PN2203	južni Jadran ²⁰	PN_CO3 GQ376024	PN1_01 GQ369005	PN2_01 GQ384034	PN2203	PN_IT07
	PN2204	južni Jadran ²⁰	PN_CO4 GQ376025	PN1_01 GQ369006	PN2_02 GQ384035	PN_MIX3	PN_IT11
	PN2301	zahodno Sredozemlje ²¹	/	PN1_01 HM358357	PN2_02 HM358360	/	PN_IT11
	PN2302	zahodno Sredozemlje ²¹	PN_CO10 HM358383	PN1_01 HM358358	PN2_01 HM358361	PN2302	PN_IT07
	PN2401	zahodno Sredozemlje ²²	PN_CO4 HM358384	/	PN2_02 HM358362	/	/
	PN2402	zahodno Sredozemlje ²²	PN2402 HM358386	/	PN2_02 HM358363	/	/
	PN2403	zahodno Sredozemlje ²²	PN2403 HM358385	/	PN2_02 HM358364	/	/
	PN2404	zahodno Sredozemlje ²²	PN2404 HM358387	/	PN2_04 HM358365	/	/
	PN2405	zahodno Sredozemlje ²²	PN2405 HM358388	/	PN2_02 HM358366	/	/

VRSTA	ID OSEBKA	GEOGRAFSKO OBMOČJE	OZNAKA HAPLOTIPA / KODA V ZBIRKI GENBANK				
<i>Pelagia noctiluca</i>	PN2406	zahodno Sredozemlje ²²	PN_CO11 HM358389	/	PN2406 HM358367	/	/
	PN2407	zahodno Sredozemlje ²²	/	/	PN2_07 HM358368	/	/
	PN2408	zahodno Sredozemlje ²²	PN_CO4 HM358390	/	PN2_01 HM358369	/	/
	PN2409	zahodno Sredozemlje ²²	PN2409 HM358391	/	PN2_02 HM358370	/	/
	PN2410	zahodno Sredozemlje ²²	PN_CO4 HM358392	/	PN2_02 HM358371	/	/
	PN2411	zahodno Sredozemlje ²²	PN_CO4 HM358393	/	PN2_02 HM358372	/	/
	PN2412	zahodno Sredozemlje ²²	PN2412 HM358394	/	PN2_10 HM358373	/	/
	PN2413	zahodno Sredozemlje ²²	PN2413 HM358395	/	PN2413 HM358374	/	/
	PN2414	zahodno Sredozemlje ²²	PN_CO4 HM358396	PN2414 HM358359	PN2_04 HM358375	PN2414	PN2414
	PN2415	zahodno Sredozemlje ²²	PN2415 HM358397	/	PN2_02 HM358376	/	/
	PN2416	zahodno Sredozemlje ²²	PN2416 HM353398	/	PN2_02 HM358382	/	/
	PN2417	zahodno Sredozemlje ²²	PN2417 HM358399	/	PN2_09 HM358377	/	/
	PN2421	zahodno Sredozemlje ²²	PN2421 HM358400	/	PN2_02 HM358378	/	/
	PN2422	zahodno Sredozemlje ²²	PN2422 HM358401	/	PN2_02 HM358379	/	/
	PN2424	zahodno Sredozemlje ²²	PN2424 HM358402	/	PN2_01 HM358380	/	/
	PN2425	zahodno Sredozemlje ²²	PN2425 HM358403	/	PN2_02 HM358381	/	/
	Peno01	zahodni Atlantik ²³	Peno01 GQ120093	/	/	/	/
	Peno05	zahodni Atlantik ²³	Peno05 GQ120094	/	/	/	/
	Peno45	zahodni Atlantik ²³	Peno45 GQ120095	/	/	/	/
	Peno51	zahodni Atlantik ²³	Peno51 GQ120096	/	/	/	/
<i>Chrysaora sp.</i>	CHR_SP	zunanja skupina	CHR_SP DQ083524	CHR_SP DQ083525	/	CHR_SP	CHR_SP
<i>Cyanea capillata</i>	CYA_CA	zunanja skupina	CYA_CA AY902911	CYA_CA U65481	CYA_CA U65481	CYA_CA	CYA_CA
<i>Aurelia aurita</i>	AUR_AU	zunanja skupina	AUR_AU AY903133	AUR_AU AY935212	AUR_AU AY935212	AUR_AU	AUR_AU
<i>Rhizostoma pulmo</i>	RP0501	severni Jadran ²⁴	/	RP0501 GQ999573	RP2_01 GQ999573	/	RP0501
	RP0502	severni Jadran ²⁴	/	RP1_01 GQ999574	RP2_01 GQ999574	/	RP_IT03
	RP1403	severni Jadran ²⁴	RP_CO1 GQ999568	RP1_01 HQ902072	RP2_01 HQ902092	RP1403	RP_IT03
	RP1404	severni Jadran ²⁴	RP_CO2 HQ902114	/	RP2_01 HQ902093	/	/
	RP1407	severni Jadran ²⁴	RP_CO1 HQ902115	/	RP2_01 HQ902094	/	/
	RP1408	severni Jadran ²⁴	RP_CO2 HQ902116	RP1_02 GQ999575	RP2_01 GQ999575	RP1408	RP_IT04
	RP1501	južno Sredozemlje ²⁵	RP_CO3 GQ999570	RP1_02 HQ902073	RP2_01 HQ902095	RP_MIX1	RP_IT04
	RP1502	južno Sredozemlje ²⁵	RP_CO3 HQ902117	RP1_02 HQ902074	RP2_01 HQ902096	RP_MIX1	RP_IT04

VRSTA	ID OSEBKA	GEOGRAFSKO OBMOČJE	OZNAKA HAPLOTIPA / KODA V ZBIRKI GENBANK				
<i>Rhizostoma pulmo</i>	RP1503	južno Sredozemlje ²⁵	RP_CO3 HQ902118	RP1_02 HQ902075	RP2_01 HQ902097	RP_MIX1	RP_IT04
	RP1505	južno Sredozemlje ²⁵	/	RP1_02 HQ902076	RP2_01 HQ902098	/	RP_IT04
	RP1506	južno Sredozemlje ²⁵	/	RP1_02 HQ902077	RP2_01 HQ902099	/	RP_IT04
	RP1601	južno Sredozemlje ²⁵	/	RP1_03 GQ999577	RP2_01 GQ999577	/	RP_IT01
	RP1602	južno Sredozemlje ²⁵	RP_CO4 GQ999571	RP1_04 GQ999578	RP2_01 GQ999578	RP_MIX2	RP_IT02
	RP1604	južno Sredozemlje ²⁵	/	RP1_03 HQ902078	RP2_01 HQ902100	/	RP_IT01
	RP1605	južno Sredozemlje ²⁵	RP_CO4 HQ902119	RP1_04 HQ902079	RP2_01 HQ902101	RP_MIX2	RP_IT02
	RP1801	severni Jadran ²⁶	RP1801 HQ902120	RP1_01 HQ902080	RP2_01 HQ902102	RP1801	RP_IT03
	RP1802	severni Jadran ²⁶	RP_CO5 GQ999569	RP1_01 HQ902081	RP2_01 HQ902103	RP_MIX3	RP_IT03
	RP1803	severni Jadran ²⁶	/	RP1_01 HQ902082	RP2_01 HQ902104	/	RP_IT03
	RP1804	severni Jadran ²⁶	RP_CO5 HQ902121	RP1_01 HQ902083	RP2_01 HQ902105	RP_MIX3	RP_IT03
	RP2005	zahodno Sredozemlje ²⁷	/	RP1_05 GQ999576	RP2_01 GQ999576	/	RP_IT05
	RP2007	zahodno Sredozemlje ²⁷	/	RP1_01 HQ902084	RP2_01 HQ902106	/	RP_IT03
	RP2008	zahodno Sredozemlje ²⁷	/	RP2008 HQ902085	RP2_01 HQ902107	/	RP2008
	RP2013	zahodno Sredozemlje ²⁷	/	RP1_01 HQ902086	RP2_01 HQ902108	/	RP_IT03
	RP2014	zahodno Sredozemlje ²⁷	/	RP1_05 HQ902087	RP2_01 HQ902109	/	RP_IT05
	RP2101	vzhodno Sredozemlje ²⁸	/	RP1_01 HQ902088	RP2_01 HQ902110	/	RP_IT03
	RP2202	severni Jadran ²⁹	RP2202 HQ902122	RP1_01 HQ902089	RP2_01 HQ902111	RP2202	RP_IT03
	RP2205	severni Jadran ²⁹	/	RP2205 HQ902090	RP2_01 HQ902112	/	RP2205
	RP2207	severni Jadran ²⁹	/	RP2207 HQ902091	RP2_01 HQ902113	/	RP2207
<i>Nemopilema nomurai</i>	NEM_NO	zunanja skupina	NEM_NO EU373728	NEM_NO AB377548	/	NEM_NO	/
<i>Rhopilema esculentum</i>	RHO_ES	zunanja skupina	RHO_ES EU373723	RHO_ES AB377589	/	RHO_ES	/

¹Kiel, Nemčija / Severno morje (N-54°25'23", E-10°12'41"), november 2005

²Gelendzhik, Rusija / Črno morje (N-44°34'19", E-38°03'04"), junij 2005

³Gdynia, Poljska / Baltsko morje (N-54°35'40", E-18°38'47"), avgust 2005

⁴Gelendzhik, Rusija / Črno morje (N-44°34'19", E-38°03'04"), september 2006

⁵Sylt, Nemčija / Severno morje (N-54°54'27", E-08°25'20"), junij 2007

⁶Trabzone, Turčija / Črno morje (N-41°0'20", E-39°44'58"), april 2010

⁷Mljet, Hrvaška / južni Jadran (N-42°46'17", E-17°21'46"), maj 2008

⁸Tržaški zaliv, Slovenija / severni Jadran (N-45°30'70", E-13°34'27"), februar 2008

⁹Malta / zahodno Sredozemlje (N-36°54'32", E-14°31'36"), januar 2006

¹⁰Bol na Braču, Hrvaška / južni Jadran (N-43°15'44", E-16°38'59"), april 2006

¹¹Dubrovnik, Hrvaška / južni Jadran (N-42°38'25", E-18°06'37"), marec 2006

¹²Olib, Hrvaška / južni Jadran (N-44°21'02", E-14°46'44"), julij 2006

¹³Premuda, Hrvaška / južni Jadran (N-44°20'10", E-14°35'38"), julij 2006

¹⁴Villefranche-sur-Mer / Lyonski zaliv, Francija / zahodno Sredozemlje (N-43°42'45", E-7°18'10"), avgust 2006

¹⁵Portorož / Tržaški zaliv, Slovenija / severni Jadran (N-45°30'70", E-13°34'27"), oktober – december 2006

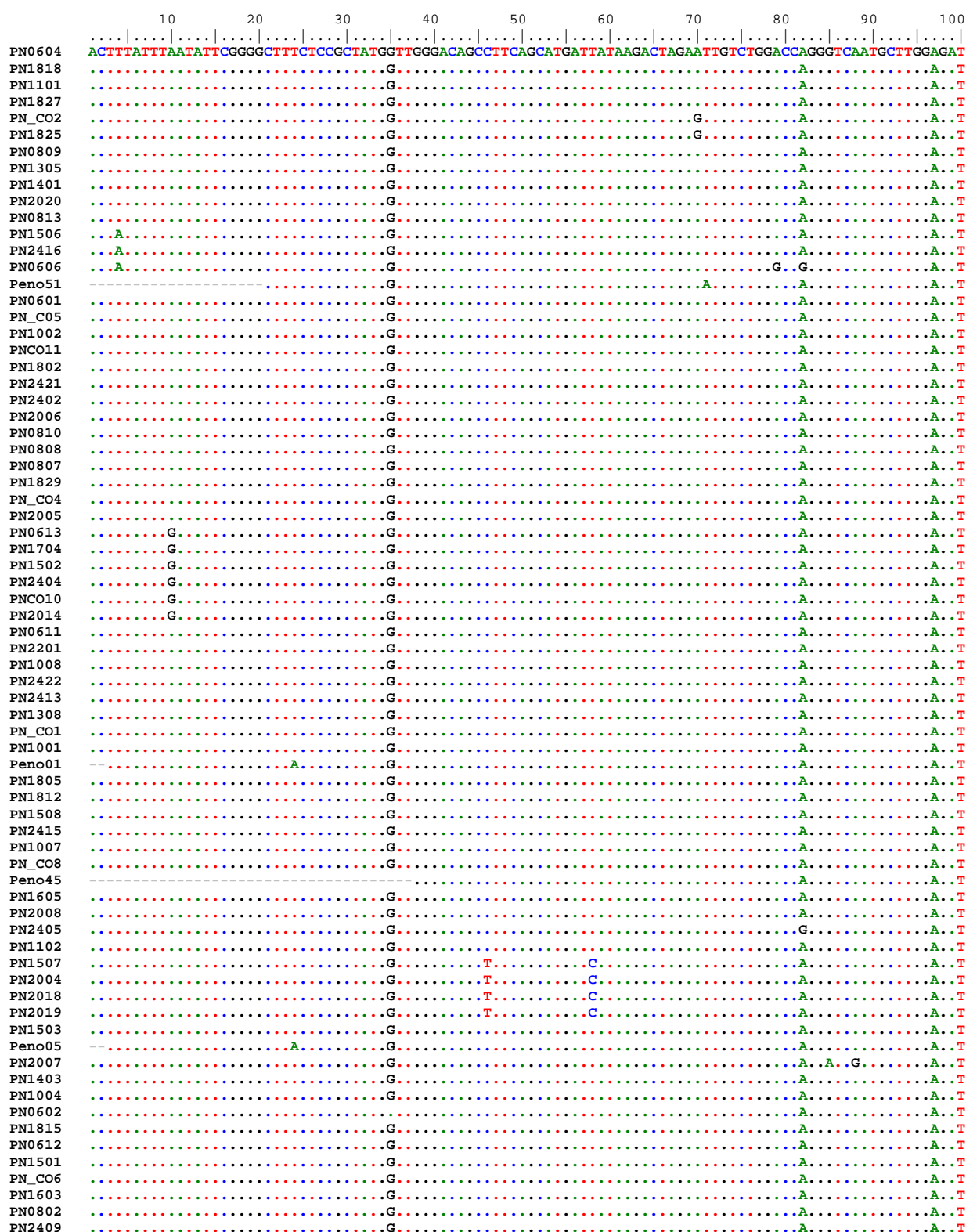
- ¹⁶Trst / Tržaški zaliv, Italija / severni Jadran (N-45°38'57", E-13°46'11"), januar 2007
- ¹⁷São Miguel, Azori / Atlantski ocean (N-37°44' 37", W-25°35' 16"), julij 2007
- ¹⁸severovzhodni Atlantski ocean (N-56°50', W-17°25'), oktober 2007
- ¹⁹Alboransko morje, zahodno Sredozemlje (N-36°06'04", W-1°40'), april 2008
- ²⁰južni Jadran (N-42°21'03", E-17°26'55"), avgust 2008
- ²¹jugovzhodna Španija / zahodno Sredozemlje, april 2008
- ²²Messina, Italija / zahodno Sredozemlje (N-38°11'42", E-15°33'53"), marec 2009
- ²³Gulf of Maine/ zahodni Atlantik (N-42°18', W-67°31'20")
- ²⁴Tržaški zaliv, Slovenija / severni Jadran (N-45°30'70",E-13°34' 27"), februar 2005, 2007
- ²⁵Tunizija, Severna Afrika / južno Sredozemlje (N-37°10'41", E-10°28'09"), julij 2007
- ²⁶Benetke, Italija / severni Jadran (N-45°23'38", E-12°23'35"), avgust 2007
- ²⁷Mar Menor, Španija / zahodno Sredozemlje (N-37°43'33", W-0°49'39"), september 2008
- ²⁸Izrael / vzhodno Sredozemlje (N-32°22'20", E-34°46'50"), oktober 2009
- ²⁹Tržaški zaliv, Slovenija / severni Jadran (N-45°30'70",E-13°34' 27"), februar 2010

Priloga B: Poravnave nukleotidnih zaporedij COI, ITS1, ITS2.

Appendix B: Sequence alignments of COI, ITS1, ITS2.

Priloga B1: Poravnava nukleotidnih zaporedij COI mesečink (*Pelagia noctiluca*).

Appendix B1: COI sequence alignment of mauve stinger (*Pelagia noctiluca*).



```

PN1701 .....G.....A.....A..T
PN0812 .....G.....A.....A..T
PN2012 .....G.....A.....A..T
PN_CO3 .....G.....A.....A..T
PN1303 .....G.....A.....A..T
PN2417 .....G.....A.....A..T
PN1010 .....G.....A.....A..T
PN1604 .....G.....A.....A..T
PN1602 .....G.....A.....A..T
PN0610 .....G.....A.....A..T
PN_CO9 .....G.....A.....A..T
PN1601 .....G.....A.....A..T
PN1806 .....G.....A.....A..T
PN1005 .....G.....A.....A..T
PN2003 .....G.....A.....A..T
PN1702 .....G.....A.....A..T
PN0805 .....G.....A.....G...A..T
PN1306 .....G.....G..A.....A..T
PN2009 .....G.....G..A.....A..T
PN2017 .....G.....G..A.....A..T
PN2015 .....G.....A.....A..T
PN1813 .....G.....G.....A..T
PN2424 .....G.....A.....A..T
PN_CO7 .....G.....A.....A..
PN0902 .....G.....A.....A..
PN0608 .....G.....A.....A..
PN2101 .....G.....A.....A..
PN2412 .....G.....A.....A..
PN0814 .....G.....A.....A..
PN1404 .....G.....A.....A..
PN1826 .....G.....A.....A..
PN2425 .....G.....A.....A..
PN0815 .....A.....A.....A..
PN2002 .....G.....A.....A..
PN0804 .....G.....A.....A..
PN2403 .....G.....A.....A..

```

```

          110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
PN0604  GACCAAATATATAATGTTGTGGTCACGGCTCACGCCCTAATAATGATTTTCTTCTCGTAATGCCTGTACTAATAGGAGGTTTGGCAATTGGTTGTAC
PN1818  .....C.....C.....C.....A..
PN1101  .....C.....C.....C.....A..
PN1827  .....C.....C.....C.....A..
PN_CO2  .....C.....C.....C.....A..
PN1825  .....C.....C.....C.....A..
PN0809  .....C.....C.....C.....A..
PN1305  .....C.....C.....C.....A..
PN1401  .....C.....C.....C.....A..
PN2020  .....C.....C.....C.....A..
PN0813  .....C.....C.....C.....A..
PN1506  .....C.....C.....C.....A..
PN2416  .....C.....C.....C.....A..
PN0606  .....C.....C.....C.....A..
Peno51  .....C.....C.....C.....A..
PN0601  .....C.....C.....C.....A..
PN_CO5  .....C.....C.....C.....A..
PN1002  .....C.....C.....C.....A..
PNCO11  .....C.....C.....C.....A..
PN1802  .....C.....C.....C.....A..
PN2421  .....C.....C.....G...C.....A..
PN2402  .....C.....C.....C.....A..
PN2006  .....C.....C.....C.....A..
PN0810  .....C.....G...C.....C.....A..
PN0808  .....G...C.....C.....C.....A..
PN0807  .....C.....C.....C.....A..
PN1829  .....C.....C.....C.....A..
PN_CO4  .....C.....C.....C.....A..
PN2005  .....C.....C.....C.....A..
PN0613  .....C.....A...C.....C.....A..
PN1704  .....C.....A...C.....C.....A..
PN1502  .....C.....C.....C.....A..
PN2404  .....C.....C.....C.....A..
PNCO10  .....C.....G...C.....C.....A..
PN2014  .....C.....C.....C.....A..
PN0611  .....C.....G...C.....C.....A..
PN2201  .....C.....C.....C.....A..
PN1008  .....C.....C.....C.....A..
PN2422  .....C.....C.....C.....A..
PN2413  .....C.....C.....C.....A..
PN1308  .....C.....C.....C.....A..
PN_CO1  .....C.....C.....C.....A..
PN1001  .....C.....C.....C.....A..
Peno01  .....C.....C.....C.....A..
PN1805  .....C.....C.....C.....A..
PN1812  .....C.....C.....C.....A..
PN1508  .....C.....C.....C.....A..
PN2415  .....C.....C.....C.....A..
PN1007  .....C.....C.....C.....A..
PN_CO8  .....C.....C.....C.....A..

```


PN2005 . . . G G . . . C . C G
PN0613 . . . G G . . . C . C G
PN1704 . . . G G . . . C . C G
PN1502 . . . G G . . . C . C G
PN2404 . . . G G . . . C . C G
PNCO10 . . . G G . . . C . C G
PN2014 . . . G G . . . C . C G
PN0611 . . . G G . . . C . C G
PN2201 . . . G C . . . G . . . C . C G
PN1008 . . . G G . . . C . C G
PN2422 . . . G G . . . C . C G
PN2413 . . . G G . . . C . C G
PN1308 . . . G G . . . C . C G
PN_CO1 . . . G G . . . C . C G
PN1001 . . . G G . . . C . C G
Pen001 . . . G G . . . C . C G
PN1805 . . . G G . . . C . C G
PN1805 . . . G G . . . C . C C G
PN1812 . . . G G . . . C . C G
PN1508 . . . G G . . . C . C A G
PN2415 . . . G G . . . C . C C . A G
PN1007 . . . G G . . . C . C C G
PN_CO8 . . . G G . . . C . C A G
Pen045 . . . G G . . . C . C A G
PN1605 . . . G G . . . C . C A G
PN2008 . . . G G . . . C . C A G
PN2405 . . . G G . . . C . C A G
PN1102 . . . G G . . . C . C A G
PN1507 . . . G G . . . C . C A G
PN2004 . . . G G . . . C . C A G
PN2018 . . . G G . . . C . C A G
PN2019 . . . G G . . . C . C A G
PN1503 . . . G G . . . C . C G
Pen005 . . . G G . . . C . C G
PN2007 . . . G G . . . C . C A G
PN1403 . . . G G . . . C . C G
PN1004 . . . G G . . . C . C G
PN0602 . . . G G . . . C . C G
PN1815 . . . G G . . . C . C G
PN0612 . . . G G . . . C . C T G
PN1501 . . . G G . . . C . C G
PN_CO6 . . . G G . . . C . C G
PN1603 . . . G G . . . C . C G
PN0802 . . . G G . . . C . C G
PN2409 . . . G G . . . C . C G
PN1701 . . . G G . . . C . C G
PN0812 . . . G G . . . C . C T G
PN2012 . . . G G . . . C . C G
PN_CO3 . . . G G . . . C . C T G
PN1303 . . . G A G . . . C . C T G
PN2417 . . . G G . . . C . C T G
PN1010 . . . G G . . . C . C G
PN1604 . . . G G . . . C . C T G
PN1602 . . . G G . . . C . C G
PN0610 . . . G G . . . C . C G
PN_CO9 . . . G G . . . C . C G
PN1601 . . . G G . . . C . C T G
PN1806 . . . G G . . . C . C T G
PN1005 . . . G G . . . C . C G
PN2003 . . . G G . . . C . C G
PN1702 . . . G G . . . C . C G
PN0805 . . . G G . . . C . C G
PN1306 . . . G G . . . C . C G
PN2009 . . . G G . . . C . C G
PN2017 . . . G G . . . C . C G
PN2015 . . . G G . . . C . C C G
PN1813 . . . G G . . . C . C G
PN2424 . . . G G . . . C . C G
PN_CO7 . . . G G G
PN0902 . . . G G G
PN0608 . . . G G G
PN2101 . . . T G G
PN2412 . . . G G G
PN0814 . . . G G G
PN1404 . . . G G G
PN1826 . . . G G G C
PN2425 . . . G G G
PN0815 . . . G G G
PN2002 . . . G G G
PN0804 . . . G G G
PN2403 . . . G G G

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
PN0604	GATAGAGCAAGGGGCCGGAACCGGCTGAACAATATACCCCTCCTCTCGTCCGATTCAAATCACATTTCAGGAGGGTCTGTTGATATGGCCATATTTAGCTTG									
PN1818				T		A				
PN1101				T		A				
PN1827				T		A				
PN_CO2				T		A				
PN1825				T		A				
PN0809				T		A				T
PN1305				T		A		G		T
PN1401				T		A				T
PN2020				T		A				T
PN0813				T		A				T
PN1506				T		A				
PN2416				T		A				
PN0606				T		A				
Peno51				T		A				
PN0601				T.C		A				
PN_CO5				T.C		A		G		
PN1002				T.C		A		G		
PNCO11				T.C		A		G		
PN1802				T.C		A		G		
PN2421				T.C		A		G		
PN2402				T.C		A		G		
PN2006				T.C		A		G		
PN0810				T.C		A		G		
PN0808				T.C		A		G		
PN0807				T.C		A		G		
PN1829				T.C		A		G		
PN_CO4				T.C		A		G		
PN2005				T.C		A		G		
PN0613	A			T.C		A		G		
PN1704	A			T.C		A		G		
PN1502	A			T.C		A		G		
PN2404	A			T.C		A		G		
PNCO10	A			T.C		A		G		
PN2014				T.C		A		G		
PN0611				T.C		A		G		
PN2201				T.C		A		G		
PN1008				T.C		A		G		
PN2422				T.C		A		G		
PN2413				T.C		A		G		
PN1308				T.C		A		G		T
PN_CO1		T		T.C		A		G		
PN1001		T		T.C		A		G		
Peno01		T		T.C		A		G		
PN1805		T		T.C		A		G		
PN1812		T		T.C		A		G		
PN1508		T		T.C		A		G		
PN2415		T		T.C		A		G		
PN1007		T		T.C		A		G		
PN_CO8		T		T.C		A		G		
Peno45		T		T.C		A		G		
PN1605		T		T.C		A		G		
PN2008		T		T.C		A		G		
PN2405		T		T.C		A		G		
PN1102		T		T.C		A		G		
PN1507		T		T.C		A		G		
PN2004		T		T.C		A		G		
PN2018		T		T.C		A		G		
PN2019		T		T.C		A		G		
PN1503		T		T.C		A		G		
Peno05		T		T.C		A		G		
PN2007		T		T.C		A		G		
PN1403		T		T.C		A		G		
PN1004		T		T.C		A		G		
PN0602		T		T.C		A		G		
PN1815		T		T.C		A		G		
PN0612		T		T.C		A		G		
PN1501		T		T.C		A		G		
PN_CO6		T		T.C		A		G		
PN1603		T		T.C		A		G		
PN0802		T		T.C		A		G		
PN2409		T		T.C		A		G		
PN1701		T		T.C		A		G		
PN0812		T		T.C		A		G		
PN2012		T		T.C		A		G		
PN_CO3		T		T.C		A		G		
PN1303		T		T.C		A		G		
PN2417		T		T.C		A		G		
PN1010		T		T.C		A		G		
PN1604		T		T.C		A		G		
PN1602		T		T.C		A		G		
PN0610		T		T.C		A		G		
PN_CO9		T		T.C		A		G		
PN1601		T		T.C		A		G		
PN1806		T		T.C		A		G		
PN1005		T		T.C		A	G			
PN2003		T		T.C		A				
PN1702		T		T.C		A				

PN0805T.C.....A.....
 PN1306T.C.....A.....
 PN2009T.C.....A.....A.....
 PN2017C.....A.....
 PN2015T.C.....A.....
 PN1813T.....A.....
 PN2424A.....
 PN_CO7C.....
 PN0902A.....
 PN0608
 PN2101
 PN2412
 PN0814
 PN1404
 PN1826
 PN2425
 PN0815C.....
 PN2002
 PN0804
 PN2403

.....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480.....490.....500.....
 PN0604 CACCTGGCTGGAGCTTCATCGATAAATGGGTGCTATAAAATTTCAATTACGACTATTATAAAATATGAGGGCACCAGGTATGACTATGGACAGGATACCTCTGT
 PN1818A.....T.G.
 PN1101A.....C.....G.
 PN1827A.....G.
 PN_CO2C.G.T.....T.....A.....G.
 PN1825A.....G.
 PN0809A.....G.
 PN1305A.....G.
 PN1401A.....G.
 PN2020A.....G.
 PN0813G.....A.....G.
 PN1506A.....G.
 PN2416A.....G.
 PN0606A.....G.
 Peno51A.....G.
 PN0601C.....A.....G.
 PN_CO5C.....A.....G.
 PN1002A.....G.
 PNCO11A.....G.
 PN1802A.....A.....G.
 PN2421A.....G.
 PN2402A.....G.
 PN2006A.....G.
 PN0810A.....G.
 PN0808A.....G.
 PN0807A.....G.
 PN1829A.....G.
 PN_CO4A.....G.
 PN2005A.....G.
 PN0613A.....G.
 PN1704A.....G.
 PN1502A.....G.
 PN2404A.....G.
 PNCO10A.....G.
 PN2014A.....G.
 PN0611A.....G.
 PN2201A.....G.
 PN1008A.....G.
 PN2422G.....A.....G.
 PN2413A.....C.....G.
 PN1308A.....G.
 PN_CO1A.....G.
 PN1001A.....G.....G.....G.
 Peno01A.....G.
 PN1805A.....G.
 PN1812A.....G.
 PN1508A.....T.....G.
 PN2415C.....A.....G.
 PN1007A.....G.
 PN_CO8A.....G.
 Peno45A.....G.
 PN1605A.....G.....G.....G.
 PN2008A.....G.
 PN2405A.....G.
 PN1102A.....G.
 PN1507A.....G.
 PN2004G.....A.....G.
 PN2018A.....G.
 PN2019A.....G.
 PN1503A.....A.....G.
 Peno05A.....A.....G.
 PN2007A.....A.....G.
 PN1403A.....G.
 PN1004G.....A.....G.
 PN0602A.....G.
 PN1815C.....A.....G.

PN0612 A A G.
 PN1501 A G.
 PN_CO6 A G.
 PN1603 A G.
 PN0802 A G.
 PN2409 A G.
 PN1701 A G.
 PN0812 A G.
 PN2012 A G.
 PN_CO3 A G.
 PN1303 A G.
 PN2417 A G.
 PN1010 A G.
 PN1604 A G.
 PN1602 A G.
 PN0610 A G.
 PN_CO9 A G.
 PN1601 C A G.
 PN1806 C A G.
 PN1005 A G.
 PN2003 A G.
 PN1702 A C G.
 PN0805 A G.
 PN1306 A G.
 PN2009 A G.
 PN2017 A G.
 PN2015 A G.
 PN1813 A G.
 PN2424 G C G G G.
 PN_CO7 G G G G.
 PN0902 G G G G.
 PN0608 G G G G.
 PN2101 G G G G.
 PN2412 C G G G.
 PN0814 G G G G.
 PN1404 C G G G.
 PN1826 G G G G.
 PN2425 G G G G.
 PN0815 C G G G.
 PN2002 G G G G.
 PN0804 G G G G.
 PN2403 G G G G.

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 PN0604 TTGTTTGGTCTGTTCTTGTACTGCTATTTTACTACTACTGTCCTCCAGTTCTAGCAGGTGCTATAACCCATGCTATTGACTGATAGGAACTTTAACAC
 PN1818 T T C
 PN1101 T C
 PN1827 T C
 PN_CO2 T C
 PN1825 T C
 PN0809 T C
 PN1305 T C
 PN1401 T C
 PN2020 T C
 PN0813 T T C
 PN1506 T C T
 PN2416 T C
 PN0606 T C
 Peno51 T C A
 PN0601 T C
 PN_CO5 T C
 PN1002 T C
 PNCO11 T C
 PN1802 C T C
 PN2421 T C
 PN2402 A T C
 PN2006 T C
 PN0810 T C
 PN0808 T C
 PN0807 T C A
 PN1829 T C T
 PN_CO4 T C
 PN2005 T C T
 PN0613 C T C
 PN1704 T C
 PN1502 T C
 PN2404 T C
 PNCO10 T C
 PN2014 T C
 PN0611 T C
 PN2201 T C G
 PN1008 T C G
 PN2422 T C
 PN2413 T C
 PN1308 T C
 PN_CO1 T C G
 PN1001 T C G
 Peno01 T C G

PN1805T.....C.....G.....
 PN1812T.....C.....
 PN1508T.....C.....
 PN2415T.....C.....
 PN1007T.....C.....
 PN_CO8T.....C.....
 Peno45T.....C.....
 PN1605T.....C.....
 PN2008T.....C.....
 PN2405T.....C.....
 PN1102T.....C.....
 PN1507T.....C.....
 PN2004T.....C.....
 PN2018T.....C.....
 PN2019T.....C.....
 PN1503T.....C.....
 Peno05T.....C.....
 PN2007T.....C.....
 PN1403T.....C.....
 PN1004T.....C.....
 PN0602T.....C.....
 PN1815T.....C.....
 PN0612T.....C.....
 PN1501T.....C.....
 PN_CO6T.....C.....
 PN1603T.....C.....
 PN0802T.....C.....
 PN2409T.....C.....
 PN1701T.....C.....
 PN0812T.....C.....
 PN2012T.....C.....
 PN_CO3T.....C.....
 PN1303T.....C.....
 PN2417T.....C.....
 PN1010T.....C.....
 PN1604T.....C.....
 PN1602T.....C.....
 PN0610T.....C.....
 PN_CO9T.....C.....
 PN1601T.....C.....
 PN1806T.....C.....
 PN1005T.....C.....G.....
 PN2003T.....C.....
 PN1702T.....C.....G.....
 PN0805T.....C.....G.....
 PN1306T.....C.....
 PN2009T.....C.....
 PN2017T.....C.....
 PN2015T.....C.....
 PN1813T.....C.....
 PN2424C.....T.....C.....
 PN_CO7T.....C.....
 PN0902T.....C.....
 PN0608T.....C.....
 PN2101T.....C.....
 PN2412T.....C.....
 PN0814T.....C.....
 PN1404T.....C.....
 PN1826A.....T.....
 PN2425T.....C.....
 PN0815T.....C.....
 PN2002T.....C.....
 PN0804T.....C.....
 PN2403T.....C.....

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 610 620 630 640 650
 PN0604 CTCCTTCTTCGATCCCTGCTGGGGGAGGAGATCCTATACCTGTTCCAGCATTGTTT
 PN1818C.G.....G.....
 PN1101C.G.....G.....
 PN1827C.G.....G.....
 PN_CO2C.....G.....
 PN1825C.....G.....
 PN0809C.G.....G.....
 PN1305C.G.....G.....
 PN1401C.....G.....
 PN2020C.....G.....
 PN0813C.....G.....
 PN1506C.....G.....
 PN2416C.....G.....
 PN0606C.....G.....
 Peno51C.....G.....
 PN0601C.....G.....
 PN_CO5C.....G.....
 PN1002C.....G.....
 PNCO11C.....G.....
 PN1802C.....G.....
 PN2421C.....G.....
 PN2402C.....G.....

PN2006C.....G.....
PN0810C.....G.....
PN0808C.....G.....
PN0807C.....G.....
PN1829C.....G.....
PN_CO4C.....G.....
PN2005C.....G.....
PN0613C.....G.....
PN1704C.....G.....
PN1502G.....C.....G.....
PN2404C.....G.....
PNCO10C.....G.....
PN2014C.....G.....
PN0611C.....G.....
PN2201 T.....C.....G.....
PN1008C.....G.....
PN2422C.....G.....
PN2413C.....G.....
PN1308C.....G.....
PN_CO1C.....G.....A.....
PN1001C.....G.....A.....
Peno01C.....G.....A.....
PN1805C.....G.....A.....
PN1812C.....G.....A.....
PN1508C.....G.....
PN2415C.....G.....
PN1007C.....G.....
PN_CO8C.....G.....
Peno45C.....G.....
PN1605C.....G.....
PN2008C.....G.....
PN2405C.....G.....
PN1102C.....G.....
PN1507C.G.....G.....
PN2004C.G.....G.....
PN2018C.....C.....G.....
PN2019C.....G.....
PN1503C.....G.....
Peno05C.....G.....
PN2007C.....G.....
PN1403C.....G.....
PN1004C.....G.....
PN0602C.....G.....
PN1815C.....G.....
PN0612C.....G.....
PN1501C.....G.....
PN_CO6C.....G.....
PN1603C.....C.....G.....
PN0802C.....T.....G.....
PN2409 T.....C.....T.....G.....
PN1701C.....T.....G.....
PN0812G.....C.....G.....
PN2012G.....C.....G.....
PN_CO3C.....G.....
PN1303C.....G.....
PN2417C.....G.....
PN1010C.....G.....
PN1604C.....G.....
PN1602C.....G.....
PN0610C.G.....G.....
PN_CO9C.G.....G.....
PN1601C.G.....G.....
PN1806C.....G.....
PN1005C.....G.....C.....
PN2003C.....G.....C.....
PN1702C.....G.....
PN0805C.....G.....
PN1306C.....G.....
PN2009C.....G.....
PN2017C.....G.....
PN2015C.....G.....
PN1813C.....G.....
PN2424C.....G.....
PN_CO7G.....C.....G.....
PN0902G.....C.....G.....
PN0608G.....C.....G.....
PN2101G.....C.....G.....
PN2412G.....C.....G.....
PN0814G.....C.....T.....
PN1404C.....G.....
PN1826C.....G.....
PN2425C.....G.....
PN0815C.....G.....
PN2002C.....G.....
PN0804C.....G.....
PN2403C.....G.....

Priloga B2: Poravnava nukleotidnih zaporedij ITS1 mesečink (*Pelagia noctiluca*).

Appendix B2: ITS1 sequence alignment of mauve stinger (*Pelagia noctiluca*).

```
      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
PN1_01  GGAAGGATCAATTACCGATCGTGTTCCTAACACACAGCTGCTACTGCCTTGCCGAGTTTGCACGTACACTGTGAACCTGTAACGATCTGTGTTGAGGTG
PN1_05  .....
PN0606  .....
PN1602  .....
PN1_02  .....
PN2011  .....
PN1_03  .....
PN1_06  .....
PN0903  .....
PN1305  .....
PN1_04  .....
PN1701  .....
PN1802  .....
PN2414  .....
```

```
     110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
PN1_01  AGCAGAGCTGGTCGCTCGAATGACAGGCGCTCTCCTGTCGGCCTCACATGGAGCTTGTAGTTGTTTTTGAAAACCTTTTAAAACCTCCAG
PN1_05  .....
PN0606  .....
PN1602  .....
PN1_02  .....
PN2011  .....
PN1_03  .....
PN1_06  .....
PN0903  .....
PN1305  .....
PN1_04  .....
PN1701  .....
PN1802  .....
PN2414  .....
```

```
     210     220     230     240     250     260     270     280
PN1_01  AATCTACGCTCAACACTGTTGGGTCAGTTAGAAGAAAGGAAGTACAACCTTCTAACGGTGGATCTCTGGCTCGT
PN1_05  .....
PN0606  .....
PN1602  .....
PN1_02  .....
PN2011  .....
PN1_03  .....
PN1_06  .....
PN0903  .....
PN1305  .....
PN1_04  .....
PN1701  .....
PN1802  .....
PN2414  .....
```



```

          310      320      330      340      350      360
PN2_02  CTTCGTTGGCTTATGCCAAACACTGACTTTGACCTCAGATCAGGCCAAGACTACCCGCTGAATTAA
PN2_05  .....
PN2_04  ...T.....
PN2413  ...T.....
PN2_06  ...T.....
PN2_07  ...T.....
PN2_08  .....
PN2006  .....
PN2_03  .....
PN2_09  .....
PN2_10  .....
PN1101  .....C.....
PN2012  .....
PN0902  .....
PN1809  .....
PN1829  .....
PN1305  ...T.....
PN2008  ...T.....
PN2011  ...T.....
PN2013  ...T.....
PN2_01  ...T.....
PN1005  ...T.....
PN2406  ...T.....A.....

```

Priloga B4: Poravnava nukleotidnih zaporedij COI uhatih klobučnjakov (*Aurelia aurita*).

Appendix B4: COI sequence alignment of moon jelly (*Aurelia aurita*).

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
AA_CO7  ACTATACTTAATATTGGTGCTTTTCCGCCATGGTGGGAACCTGCCTTCAGTATGATTATAAGACTGGAACATCAGGCCAGGATCCATGTTGGGGAC
AA_BH1  .....
AA_BH3  .....
AA_AN3  .....
AA0803  .....
AA1225  .....
AA_CO2  .....
AA_AN5  .....
AA2711  .....
AX0811  .....
AA2721  .....
AA1220  .....
AA_BOS  .....
AA_AN1  .....
AA_GUL  .....
AA2709  .....
AA_CO1  .....
AX1901  .....
AX1903  .....
AA_BH2  .....
AA_CO6  ...T.G...C...C..T..T...A...T...A...T.A...T...A..T...A..A..T
AA2205  ...T.G...C...C..T..T...A...T...A...T.A...T...A..T...A..A..T
AA_ML2  ...T.G...C...C..T..T...A...T...A...T.A...T...A..T...A..A..T
AA_CO5  ...T.G...C...C..T..T...A...T...A...T.A...T...A..T...A..A..T
AA_ML1  ...C.T.G...C...C..T..T...A...T...A...T.A...T...A..T...A..A..T
AA_NA1  ...T...C...T..T...A...T...T...T...A..T..G..T..C.A..T...
AA_CO8  ...T...C...T..T...A...T...T...T...A..T..G..T..C.A..T...
AA_NA2  ...T...C...T..T...A...T...T...T...A..T..G..T..C.A..T...
AA_CO3  ...T...C...T..T...A...T...T...T...A..T..G..T..C.A..T...
AA_CO4  ...T...C...T..T...A...T...T...T...A..T..G..T..C.A..T...

```



```

          310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
AA_CO7  TATAGAACAAAGGAGCAGGTA CTGGTTGAACCATTTACCCCTCTTTAAGTTCAATACAAGCTCATTCTGGAGGTT CAGTAGATATGGCCATATTTAGTCTT
AA_BH1  .....C.....
AA_BH3  .....C.....
AA_AN3  .....
AA0803  .....
AA1225  .....G.....
AA_CO2  .....G.....
AA_AN5  .....G.....
AA2711  .....G.....
AX0811  .....G.....
AA2721  .....G.....
AA1220  .....G.....
AA_BOS  .....G.....
AA_AN1  .....G.....
AA_GUL  .....G.....
AA2709  .....G.....
AA_CO1  .....G.....
AX1901  .....T.....
AX1903  .....T.....
AA_BH2  .....
AA_CO6  A...G...A...T...A...T...CC...C...T...C...C...A...T...
AA2205  A...G...A...T...A...T...CC...C...T...C...C...A...T...
AA_ML2  A...G...A...T...A...T...CC...C...T...C...C...A...T...
AA_CO5  A...G...A...T...A...T...CC...C...T...C...C...A...T...
AA_ML1  A...G...A...T...A...T...CC...C...T...C...C...A...T...
AA_NA1  .....G...A...G...TG...C...T...C...G...T...C...A...C...T...A
AA_CO8  .....G...A...G...TG...C...T...C...G...T...AG...C...A...C...T...A
AA_NA2  .....G...A...G...TG...C...T...C...G...T...G...C...A...C...T...A
AA_CO3  .....G...A...G...TG...C...T...C...G...T...G...C...A...C...T...A
AA_CO4  .....G...A...G...TG...C...T...C...G...T...G...C...A...C...T...A

```

```

          410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
AA_CO7  CATTTAGCAGGAGCTTCCTCTATTATGGGTGCTATAACTTTATTACCCTATTTTAAATATGAGAGCCCCCTGGTATGACCATGGATAGAATACCTTTAT
AA_BH1  .....
AA_BH3  .....
AA_AN3  .....
AA0803  .....G.....
AA1225  .....C.....
AA_CO2  .....G...A...C...A...A...C...C...A...G...T...A...T...C...G...
AA_AN5  .....
AA2711  .....C.....
AX0811  .....
AA2721  .....G.....
AA1220  .....
AA_BOS  .....
AA_AN1  .....
AA_GUL  .....
AA2709  .....
AA_CO1  .....T.....T.....
AX1901  .....T.....T.....
AX1903  .....T.....
AA_BH2  .....
AA_CO6  .....G...A...C...A...A...C...C...A...G...T...A...T...C...G...
AA2205  .....G...A...C...A...A...C...C...A...G...T...A...T...C...G...
AA_ML2  .....G...A...C...A...A...C...C...A...G...T...A...T...C...G...
AA_CO5  .....G...A...C...A...A...C...C...A...G...T...A...T...C...G...
AA_ML1  .....G...A...C...A...A...C...C...A...G...T...A...T...C...G...
AA_NA1  .....G...C...A...A...A...T...A...C...A...C...A...T...C...AG...C...
AA_CO8  .....G...C...A...A...A...C...T...A...C...A...C...A...T...C...AG...CC...
AA_NA2  .....G...C...A...A...A...C...T...A...C...A...C...A...T...C...AG...C...
AA_CO3  .....G...C...A...A...A...C...T...A...C...A...C...A...T...C...AG...C...
AA_CO4  .....C...G...C...A...A...A...C...T...A...C...A...C...A...T...C...AG...C...

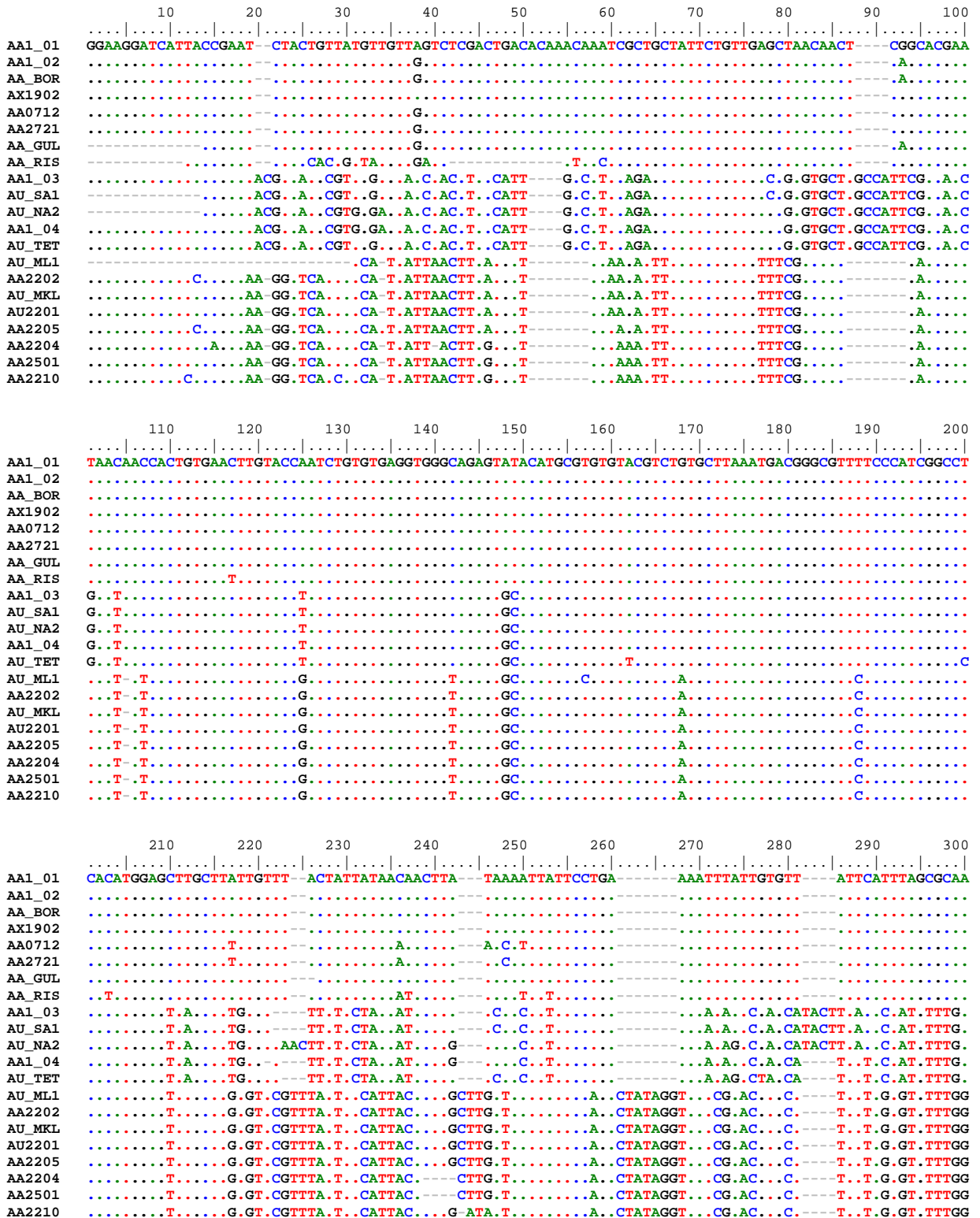
```

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
AA_CO7 TCGTATGATCTGTATTAGTTACTGCAATCTTATTATTGTTGCCCTACCCGTATTAGCTGGGGCAATTACCATGTTGTTGACTGATAGAAATTCAACAC
AA_BH1
AA_BH3
AA_AN3C.....
AA0803
AA1225
AA_CO2
AA_AN5
AA2711
AX0811
AA2721
AA1220A.....
AA_BOSA.....
AA_AN1R.....
AA_GUL
AA2709 .T.....
AA_CO1 .T.....G.....T.....
AX1901 .T.....G.....C.....
AX1903 .T.....T.....
AA_BH2C.....
AA_CO6 .T..T.....T..G..A..A..G..A..C..GC..T..A..TC.....TC.....A.....T.....A..A.....T.....
AA2205 .T..T.....T.....A..A..G..A..C..GC..T..A..TC.....TC.....A.....T.....A..A.....T.....
AA_ML2 .T..T.....T.....A..A..G..A..C..GC..T..A..TC.....T..TC.....A.....T.....A..A.....T.....
AA_CO5 .T..T.....T.....A..A..G..A..C..GC..T..A..TC.....T..TC.....A.....T.....A..A.....T.....
AA_ML1 .T..T.....T.....A..A..G..A..C..GC..T..A..TC.....T..TC.....A.....T.....A..A.....T.....
AA_NA1 .T..C.....C.....G..GC.....A.....T..G..A..A.....A..T.....A..A..C..C..G..C..T..T.....
AA_CO8 .T..C.....G..GC.....A.....T..G..A..A.....A..T.....AC..A..C..C..G..C..T..T.....
AA_NA2 .T..C.....G..GC.....A.....T..G..A..A.....A..T.....AC..A..C..C..G..C..T..T.....
AA_CO3 .T..C.....G..GC.....A.....T..G..A..A.....A..T.....AC..A..C..C..G..C..T..T.....
AA_CO4 .T..C.....G..GC.....A.....T..G..A..A.....A..T.....AC..A..C..C..G..C..T..T.....

610 620 630 640 650
AA_CO7 ATCCTTCTTTGACCCGTGCTGGGGGAGGAGATCCAATACTATTCCAACATTTATTT
AA_BH1
AA_BH3
AA_AN3
AA0803
AA1225
AA_CO2
AA_AN5
AA2711
AX0811
AA2721
AA1220
AA_BOS
AA_AN1A.....C.....
AA_GULT.....
AA2709C.....
AA_CO1T.....
AX1901T.....
AX1903 .T.....T.....
AA_BH2
AA_CO6 G..A.....T.....A..A.....C..C..T..G.....CC..C..C
AA2205 G..A.....T.....A..A.....C..C..T..G.....CC..C..C
AA_ML2 G..A.....T.....A..A.....C..C..T..G.....CC..C..C
AA_CO5 G..A.....T.....A..A.....C..C..T..G.....CC..C..C
AA_ML1 G..A.....T.....A..A.....C..C..T..G.....CC..C..C
AA_NA1T..T.....C..A.....T..T..T..G..CC..C..C
AA_CO8 .T..T.....T.....C..A.....T..T..T..G..CC..C..C
AA_NA2T..T.....C..A.....T..T..T..G..CC..C..C
AA_CO3T..T.....C..A.....T..T..T..G..CC..C..C
AA_CO4T..T.....C..A.....T..T..T..G..CC..C..C

Priloga B5: Poravnava nukleotidnih zaporedij ITS1 uhatih klobučnjakov (*Aurelia aurita*).

Appendix B5: ITS1 sequence alignment of moon jelly (*Aurelia aurita*).



```

          310      320      330      340      350      360
AA1_01  TG-----AAGATGTTAAAAAAATGAAATCAACTTCTAACGGTGGATCTCTTGGCTCGT
AA1_02  .....
AA_BOR  .....
AX1902  .....
AA0712  .....
AA2721  .....
AA_GUL  .....
AA_RIS  .....
AA1_03  .T-----T.A--C-----G-----
AU_SA1  .T-----T.A--C-----G-----
AU_NA2  CT-----T.A--C-----G-----
AA1_04  CT-----T.A--C-----G-----
AU_TET  CT-----T.A--C-----G-----
AU_ML1  .TATTTAT..AG.AGA-----G-----
AA2202  .TATTTAT..AG.AGA-----G-----
AU_MKL  .TATTTAT..AG.AGA-----G-----
AU2201  .TATTTAT..AG.AGA-----G-----
AA2205  .TATTTAT..AG.AGA-----G.....CT-----G-----
AA2204  .TATTTAT..AG.TGA-----G-----
AA2501  .TATTTAT..AG.TGA-----G-----
AA2210  .TATTTAT..AG.TGA-----G.....T-----A-----G-----

```

Priloga B6: Poravnava nukleotidnih zaporedij ITS2 uhatih klobučnjakov (*Aurelia aurita*).

Appendix B6: ITS2 sequence alignment of moon jelly (*Aurelia aurita*).

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
AU_ML1  CAGCTGCGAT AAGTAGTGTGAATTGCAGAACTCAGCGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAAATGGCGCTCCCTGGTTCTCCAGGGAGCATGCTCTGTCTGAG
AA2204  .....
AA2201  .....
AA2_05  .....
AA_GUL  .....
AA2_04  .....
AA0713  .....
AA2_01  .....
AA1220  .....
AA2_02  .....
AA2501  .....
AX0807  .....
AX1904  .....
AA2722  .....
AU_NA2  .....
AA1712  .....
AA2_03  .....
AU_SA1  .....
AA1711  .....
AA2714  .....
AA2711  .....

          110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
AU_ML1  CGTCATGTC AAGAATCT--ACACACACTTACGTTGTTTTTG-----TAGCATCAAGTGTGTGGCGTTGAGATATCACAGCCAATCACTAAAAAACTGA
AA2204  .....
AA2201  .....
AA2_05  .....AC-----
AA_GUL  .....T.C.--.....CGT.....C.ACG-----GCG.T-----C.....G.....T.....AG
AA2_04  .....T.C.--.....CGT.....C.ACG-----GCG.T-----C.....G.....T.....AG
AA0713  .....T.C.--.....CGT.....C.ACG-----GCGAT-----C.....G.....T.....AG
AA2_01  .....T.C.--.....CGT.....C.ACG-----GCG.T-----C.....G.....T.....AG
AA1220  .....T.C.--.....CGT.....C.ACG-----GCG.T-----C.....G.....T.....AG
AA2_02  .....T.C.--.....CGT.....C.ACG-----GCG.T-----C.....G.....T.....AG
AA2501  .....T.C.--.....CGT.....C.ACG-----GCG.T-----C.....G.....T.....AG
AX0807  .....T.C.--.....CGT.....C.ACG-----GCG.T-----C.....G.....T.T..AG
AX1904  .....C.....T.C.--.....CGT.....C.ACG-----GCG.T-----C.....G.....T.....AG
AA2722  .....T.C.--.....CGT.....C.ACG-----GCG.T-----C.....G.....T.....AG
AU_NA2  .....C.--.....GT.C.C.G.G.A-----.....C.A.....C.....AG
AA1712  .....C.--.....GT.C.C.G.G.A-----.....C.A.....C.....AG
AA2_03  .....C.--.....GT.C.C.GCC.AGTGCAG.GTA.G-----C.....C.....AG
AU_SA1  .....C.--.....GT.C.C.GCC.AGTGCAG.GTA.G-----C.....C.....AG
AA1711  .....C.--.....GT.C.C.GCC.AGTGCAG.GTA.G-----C.....C.....AG
AA2714  .....T.GACCAG..G.....CGTCAC.CG.C.G.C-----G.G.G.....T.....GC.A..TGAG..GCG.AG.
AA2711  .....T.GACCAG..G.....CGTCAC.CG.C.G.C-----G.G.G.....T.....GC.A..TGAG..GCG.AG.

```

```

      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
AU_ML1  TGATCTTTTTCGTGACTGACTGCGTGTCTCGAAATGAAGTATCCAACCGCTCCAATCTCGTGCA-----GTCTGA-GTGAGCGCAGCATAACTG-A
AA2204  .....
AA2201  .....
AA2_05  .....
AA_GUL  ..A..G...C...TT..G.....A.....A.....A.....A.....C..A...A...A...A...
AA2_04  ..A..G...TT..G.....A.....A.....A.....A.....C..A...A...A...A...
AA0713  ..A..G...TT..G.....A.....A.....A.....A.....C..A...A...A...A...
AA2_01  ..A..G...TT..G.....A.....A.....A.....A.....C..A...A...A...A...
AA1220  ..A..G...TT..G.....A.....A.....A.....A.....C..A...A...A...A...
AA2_02  ..A..G...TT..G.....A.....A.....A.....A.....C..A...A...A...A...
AA2501  ..A..G...TT..G.....A.....A.....A.....A.....C..A...A...A...A...
AX0807  ..A..G...TT..G.....A.....A.....A.....A.....C..A...A...A...A...
AX1904  ..A..G...TT..G.....A.....A.....A.....A.....C..A...A...A...A...
AA2722  ..A..G...TT..G.....A.....A.....A.....A.....C..A...A...A...A...
AU_NA2  C..A..CG...T..G.....A.....A.....A.....A.....C..A...A...A...A...
AA1712  C..A..CG...T..G.....A.....A.....A.....A.....C..A...A...A...A...
AA2_03  C..A..CG...T..G.....A.....A.....A.....A.....C..A...A...A...A...
AU_SA1  C..A..CG...T..G.....A.....A.....A.....A.....C..A...A...A...A...
AA1711  C..A..CG...T..G.....A.....A.....A.....A.....C..A...A...A...A...
AA2714  ..G..C...CTC...C..T..G..C..GCA..T...A..A..AC..CAGGCAGTG...GT...A...A...A...AC..
AA2711  ..G..C...CTC...C..T..G..C..GCA..T...A..A..AC..CAGGCAGTG...GT...A...A...A...AC..

```

```

      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
AU_ML1  TTGC-TTCACAGCAC-ACATACCTGCTCTCATCTCAACGGCAGAGATTGATTTTGACGACCAAGTGATAAAAGAACAAAACCAAATTTTTTCC
AA2204  .....
AA2201  .....
AA2_05  .....A.....
AA_GUL  ...CCAA.A...TAC.....C.....A...ACC...GG...T.CCTTTCG.C..G.GA.A
AA2_04  ...CCAA.A...TAC.....C.....A...ACC...GG...T.CCTTTCG.C..G.GA.A
AA0713  ...CCAA.A...TAC.....C.....A...ACC...GG...T.CCTTTCG.C..G.GA.A
AA2_01  ...CCAA.A...TAC.....C.....A...ACC...GG...T.CCTTTCG.C..G.GA.A
AA1220  ...CCAA.A...TAC.....C.....A...ACC...GG...T.CCTTTCG.C..G.GA.A
AA2_02  ...CCAA.A...TAC.....C.....A...ACC...GG...T.CCTTTCG.C..G.GA.A
AA2501  ...CCAA.A...TAC.....C.....A...ACC...GG...T.CCTTTCG.C..G.GA.A
AX0807  ...CCAA.A...TAC.....C.....A...ACC...GG...T.CCTTTCG.C..G.GA.A
AX1904  ...CCAA.A...TAC.....C.....A...ACC...GG...T.CCTTTCG.C..G.GA.A
AA2722  ...CCAG.A...TAC.....C.....A...ACC...GG...T.CCTTTCG.C..G.GA.A
AU_NA2  C...TG..T.....T.....C..TG...CC...GG...TC.TTTTG.T.CA.A.GAT
AA1712  C...TG..T.....T.....C..TG...CC...GG...TC.TTTTG.T.CA...AT
AA2_03  C...TG..T.....T.....C..TG...CC...GG...TC.TTTTG.T.CA...AT
AU_SA1  C...TG..T.....T.....C..TG...CC...GG...TC.TTTTG.T.CA...AT
AA1711  C...TG..T.....T.....C..TG...CC...GG...TC.TTTTG.T.CA...AT
AA2714  A..T-----G.CGTGGT...A...C..G..C..AGTG.CTTG.G..TT..G.G..AGC.TG..C..GC.G..GC.GCAGGGAG.A
AA2711  A..T-----G.CGTGG...A...C..G..C..GTG.CTTG.G..TT..G.G..AGC.TG..C..GC.G..GC.GCAGGGAG.A

```

```

      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
AU_ML1  AACTCTCATATTTCCCTC-CAAGGAACATGATTCGCTCAAGTTCGATCATTTAGAGGAAGTAAAAGTTCTAAAAAAGAGTTTGTGATTTTGACCTC
AA2204  .....
AA2201  .....
AA2_05  .....ATATAT.A.....A.....
AA_GUL  C..T.ACG.G..G.ATGTTGA.AC...AC.T..TTC...CT.G.CG.TTTCAAA.....
AA2_04  C..T.ACG.G..G.ATGTTGA.AC...AC.T..TTC...CT.G.CG.TTTCAAA.....
AA0713  C..T.ACG.G..G.ATGTTGA.AC...AC.T..TTC...T..CG.TTTCAAA.....
AA2_01  C..T.ACG.G..G.ATGTTGA.AC...AC.T..TTC...T..CG.TTTCAAA.....
AA1220  C..T.ACG.G..G.ATGTTGA.AC...AC.T..TTC...CT..TG.TTTCAAAG.....
AA2_02  C..T.ACG.G..G.ATGTTGA.AC...AC.T..TTC...CT..TG.TTTCAAA.....
AA2501  C..T.ACG.G..G.ATGTTGA.AC...AC.T..TTC...CT..TG.TTTCAAA.....
AX0807  C..T.ACG.G..G.ATGTTGA.AC...AC.T..TTC...CT..TG.TTTCAAA.....
AX1904  C..T.ACG.G..G.ATGTTGA.AC...AC.T..TTC...CT..TG.TTTCAAA.....
AA2722  C..T.ACG.G..G.ATGTTGA.AC...AC.T..TTC...CT..TG.TTTCAAAG.....
AU_NA2  C..T.T.G..GA..GA.TCAAAA..TT..TA..G..A.CAA..CAA..GC..C..AA.....
AA1712  C..T.T.G..GA..GA.TCAAAA..TT..TA..G..A.CAA..CAA..GC..C..AA.....
AA2_03  C..T.T.G..GA..GA.TCAAAA..TT..TA..G..A.CAA..CAA..GC..C..AA.....
AU_SA1  C..T.T.G..GA..GA.TCAAAA..TT..TA..G..A.CAA..CAA..GC..C..AA.....
AA1711  C..T.T.G..GA..GA.TCAAAA..TT..TA..G..A.CAA..CAA..GC..C..AA.....
AA2714  C..GTGGCGC.C.G.ATGCAAA.G.TGT.G.AG..C...G.T.ATGA..CAA..GC..C..AA.....
AA2711  C..GTGGCGC.C.G.ATGCAAA.G.TGT.G.AG..C...G.T.ATGA..CAA..GC..C..AA.....

```

```

      510      520      530
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AU_ML1  AGATCAGGCAAGACTACCCGCTGAATTTAA
AA2204  .....
AA2201  .....
AA2_05  .....
AA_GUL  .....
AA2_04  .....
AA0713  .....
AA2_01  .....
AA1220  .....
AA2_02  .....
AA2501  .....
AX0807  .....
AX1904  .....
AA2722  .....
AU_NA2  .....
AA1712  .....
AA2_03  .....
AU_SA1  .....
AA1711  .....
AA2714  CC.ATCA.....AC.A...C.....
AA2711  .....

```

Priloga B7: Poravnava nukleotidnih zaporedij COI velikih klobučnjakov (*Rhizostoma pulmo*).

Appendix B7: COI sequence alignment of barrel jellyfish (*Rhizostoma pulmo*).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
RP_CO1  AACACTATATTAAATATTGGAGCCTTTCCGCTATGATAGGAAGCTGCTTTCAGTATGATTATAAGATTAGAATTATCTGGTCCAGGATCCATGTTGGGT
RP_CO2  .....
RP1801  .....
RP_CO3  ..G.....C.....
RP_CO4  .....
RP_CO5  .....
RP2202  .....

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
RP_CO1  GATGATCAACTATATAATGTTGTAGTGACAGCCACGCATTGATTATGATATTTTCTTTGTTATGCCAGTGTGATAGGAGGTTTGGAACTGGTTAG
RP_CO2  .....
RP1801  .....
RP_CO3  .....
RP_CO4  .....
RP_CO5  .....
RP2202  .....

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
RP_CO1  TTCCTTTATATATAGGGGCACCAGACATGGCCTTCCCAAGGTTAAATAATATTAGTTTTGATTACTTCTCCTGCACTACTACTATTGCTAGGTTCTTC
RP_CO2  .....
RP1801  .....
RP_CO3  .....
RP_CO4  .....
RP_CO5  .....
RP2202  .....

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
RP_CO1  TCTTGTAGAACAAAGGTGCGGGAACAGGTTGGACAATTTATCCTCCTTAAGTTCGATCCAGGCCATTCCAGGAGGTTCTGTGGATATGGCCATCTTCAGT
RP_CO2  .....
RP1801  .....
RP_CO3  .....
RP_CO4  .....G.....C.....C.....
RP_CO5  .....A.....
RP2202  .....G.....A.....

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
RP_CO1  TTACACTTAGCAGGAGCTTCCTCTATAATGGAGCTATAATTTTCATTACTACTATCTTGAATATGAGGGCTCCCGGTATGACTATGGATAAAATTCCTT
RP_CO2  .....
RP1801  .....
RP_CO3  .....
RP_CO4  .....
RP_CO5  .....
RP2202  .....

```

```

      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
RP_CO1  TGTTTGATGGTCTGTTCTAGTCACAGCAATATTATTGTTATTGTCCTTACCTGTTTGTAGCTGGGGCTATTACAATGCTACTTACAGATAGAAATTTTAA
RP_CO2  .....
RP1801  .....
RP_CO3  .....
RP_CO4  .....
RP_CO5  .....
RP2202  .....

      610      620      630      640      650
RP_CO1  TACTTCTTCTTCGACCCAGCGGGAGGAGGAGATCCTATTTTATTTCAGCATTGTTT
RP_CO2  .....
RP1801  .....
RP_CO3  .....
RP_CO4  .....
RP_CO5  .....
RP2202  .....

```

Priloga B8: Poravnava nukleotidnih zaporedij ITS1 velikih klobučnjakov (*Rhizostoma pulmo*).

Appendix B8: ITS1 sequence alignment of barrel jellyfish (*Rhizostoma pulmo*).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
RP1_03  GGAAGGATCATTACTGATATATTGAGGATGACCGTTCGATCAGCAACAGCCGTCGTCGATTGCTTGCACACTGATTGAAAAACCAGTTTGTACAAACA
RP1_04  .....
RP1_05  .....
RP1_01  .....
RP2207  .....
RP2205  .....
RP0501  .....
RP1_02  .....
RP2008  .....

      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
RP1_03  CCACTGTGAACCTGTACCCATCCGTGTGAGGTGGACAGAGTGCACGAAGAAGCACTACATTGTACTCTCTTGTATTGGACTGTCGTACGTGTACGCTT
RP1_04  .....T.....
RP1_05  .....T.....
RP1_01  .....T.....
RP2207  .....T.....
RP2205  .....T.....
RP0501  .....
RP1_02  .....
RP2008  .....C.....

      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
RP1_03  GTGCTTAAATGAAAGGCATTCCCTTTCGGCCTCACATTGGAGTTTTCTTATATCGTATTCCGGTGGTGTGTTTTCGAATTCGTTCCGAATTCGTTCCGAAA
RP1_04  .....
RP1_05  .....
RP1_01  .....
RP2207  .....A.....
RP2205  .....
RP0501  .....
RP1_02  .....
RP2008  .....C.....T

      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
RP1_03  CAGTCAGCCACACTTTCACACATAAATATTTACTGAATATTTTGGACGTGCTTGTGTCACGGCGATGGAAAAATGAAATACAACTTCTAACGG
RP1_04  .....
RP1_05  .....A.....
RP1_01  .....
RP2207  .....A.....
RP2205  .....
RP0501  .....A.....
RP1_02  .....
RP2008  .....

      410
RP1_03  TGGATCTCTTGGCTCGT
RP1_04  .....
RP1_05  .....
RP1_01  .....
RP2207  .....
RP2205  .....
RP0501  .....
RP1_02  .....
RP2008  G.....

```

Priloga B9: Nukleotidno zaporedje ITS2 velikega klobučnjaka (*Rhizostoma pulmo*).

Appendix B9: ITS2 sequence of barrel jellyfish (*Rhizostoma pulmo*).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
RP2_01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
        CAGCTGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAACCCAGCGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAAATGGCGCTCCCTTGGTTCTCCAGGGAGCATGTCGTCTGAG
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
RP2_01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
        CGTCATGTCAAAATACTAACACACTCACGTCCTTGTGGCGTACGTGTGGCGTTGAGACTTCACGGCAGAAGCATGGACGATCATCGTTCGCGCGGTGCCGC
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
RP2_01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
        GTGTCTTCAAATGGAGTCAGTACAGCTCGTGTCTCTCACCTTGTGTGTGTACGATCGAGAGCAGCGACAAGCTATCAGCATTTGAAGTCTGCCTCTC
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
RP2_01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
        GGCTCGTACTACCCATACTTTAACGGTGTGCGAGCTTGCAGTGCCTGTCACAGTGACGCGTGCCTTTATTGCCGCCGCACTGTTGTTTTGACCTCAGAT
      410     420
RP2_01  ....|....|....|....|....|....|
        CAGGCAGGACTACCCGCTGAATTTAA

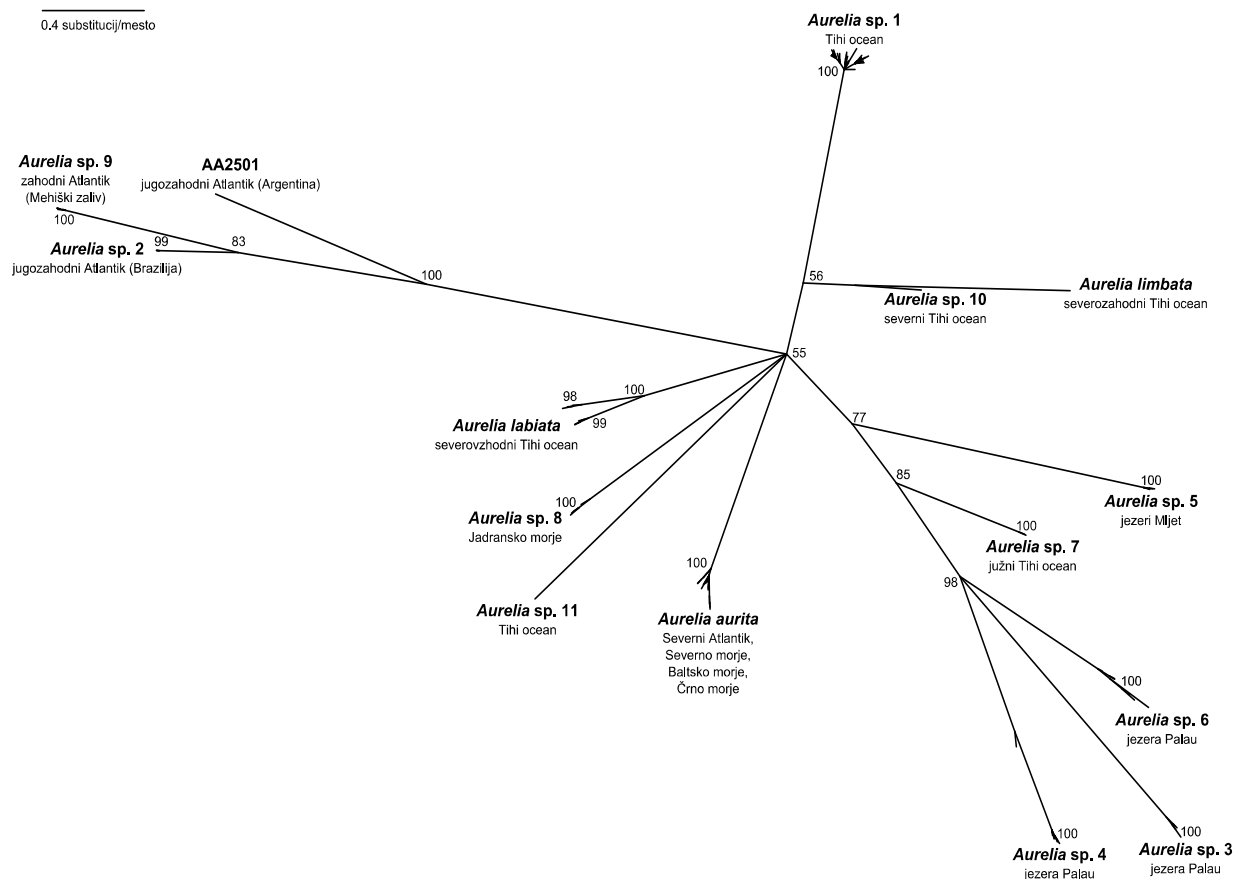
```


Priloga C: Rekonstrukcija filogenetskih odnosov v rodu *Aurelia*.

Appendix C: Reconstruction of phylogenetic relationships within genus *Aurelia*.

Priloga C1: Filogenetski odnosi v rodu *Aurelia* ugotovljeni z Bayesovim statističnim pristopom na osnovi nukleotidnih zaporedij COI in evlucijskega modela HKY+I+G. Številke na razcepiščih prikazujejo posteriorno verjetnost. V analizo so bila vključena nukleotidna zaporedja COI pridobljena v okviru te raziskave in objavljena nukleotidna zaporedja COI uhatih klobučnjakov v podatkovni zbirki GenBank do 13/02/2011.

Appendix C1: Phylogenetic relationships within genus *Aurelia* derived by Bayesian inference based on COI sequences and HKY+I+G model of evolution. Numbers at nodes indicate posterior probabilities. Analysis included COI sequences retrieved during this study and all moon jelly COI sequences from GenBank up to 13/02/2011.



Priloga C2:

Filogenetski odnosi v rodu *Aurelia* ugotovljeni z Bayesovim statističnim pristopom na osnovi nukleotidnih zaporedij ITS1. Uporabljen evlucijski model je SYM+G. Številke na razcepiščih prikazujejo posteriorno verjetnost. V analizo so bila vključena nukleotidna zaporedja ITS1, pridobljena v okviru te raziskave in vsa objavljena zaporedja ITS1 uhatih klobučnjakov v javni zbirki GenBank do 13/02/2011. Haplotipi, ki so napisani poudarjeno, so pridobljeni tekom te raziskave. Oznake haplotipov ustrezajo osebkom v Prilogi A ali kodi iz GenBank.

Appendix C2:

Phylogenetic relationships within genus *Aurelia* derived by Bayesian inference based on ITS1 sequences and SYM+G model of evolution. Numbers at nodes indicate posterior probabilities. Analysis included ITS1 sequences retrieved during this study and all published *Aurelia* COI sequences from GenBank up to 13/02/2011. Bolded haplotypes are new haplotypes, retrieved during this study. Haplotypes are labeled as in Appendix A or with GenBank Accession Number.

