

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Irena BEVK

**UGOTAVLJANJE VRSTNE PRIPADNOSTI
POPULACIJ IZOPODNIH RAKOV IZ RODU
ASELLUS V VZHODNI EVROPI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Irena BEVK

**UGOTAVLJANJE VRSTNE PRIPADNOSTI POPULACIJ
IZOPODNIH RAKOV IZ RODU *ASELLUS* V VZHODNI EVROPI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF THE SPECIES OF EASTERN-EUROPEAN
POPULATIONS OF ISOPOD CRUSTACEANS OF GENUS *ASELLUS***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študijskega programa Biologija. Opravljeno je bilo na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Rudija Verovnika, za recenzentko pa doc. dr. Simono Prevorčnik.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Cene FIŠER

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Simona PREVORČNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: izr. prof. dr. Rudi VEROVNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 22. 9. 2016

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

Irena Bevk

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 595.373(043.2)
- KG *Asellus aquaticus*/*Asellus monticola*/polimerazna verižna reakcija/filogenetska analiza/vzhodna Evropa/kriptične vrste
- AV BEVK, Irena
- SA VEROVNIK, Rudi (mentor)/PREVORČNIK, Simona (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2016
- IN UGOTAVLJANJE VRSTNE PRIPADNOSTI POPULACIJ IZOPODNIH RAKOV IZ RODU *ASELLUS* V VZHODNI EVROPI
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP VIII, 32 str., 2 pregl., 8 sl., 40 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V diplomskem delu smo raziskovali vrstno pripadnost populacij izopodnih rakov iz rodu *Asellus* na območju vzhodne Evrope, kjer sta bili doslej opisani vrsti *Asellus aquaticus* in *A. monticola*. Analizirali smo 54 osebkov iz 25 nahajališč. Iz analiziranih osebkov smo izolirali DNK in nato pomnoževali odseke genov za COI in 28S rRNK. Dobljene sekvence smo uporabili za izdelavo filogenetskih dreves po Bayesovi metodi. V filogenetskih analizah so se analizirani osebki razporedili v osem dobro podprtih kladov, ki so večinoma geografsko ločeni. Nominotipski vrsti *A. aquaticus* pripada večina analiziranih vzorcev z območja južne in zahodne Rusije, Kazahstana ter Ukrajine. V slednji se simpatrično pojavlja genetsko ločena populacija osličkov, ki pripada novi, še neopisani vrsti. Vzorca iz Gruzije pripadata vrsti *A. monticola*, vzorci iz Irana pa so se uvrstili v ločen klad, ki najverjetneje predstavlja še eno neopisano vrsto. Za primerjavo smo v analizo vključili še nekaj vzorcev vodnih osličkov iz severnega in vzhodnoazijskega dela Rusije, ki pripadajo vrstama *A. latifrons* in *A. levanidovorum* ter dvema kladoma, ki sta očitno ozko sorodna, a geografsko ločena. Rezultati kažejo, da je za rod *Asellus* značilna kriptična diverziteteta.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 595.373(043.2)
- CX *Asellus aquaticus*/*Asellus monticola*/polymerase chain reaction/phylogenetic analysis/Eastern Europe/cryptic species
- AU BEVK, Irena
- AA VEROVNIK, Rudi (supervisor)/PREVORČNIK, Simona (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
- PY 2016
- TI DETERMINATION OF THE SPECIES OF EASTERN-EUROPEAN POPULATIONS OF ISOPOD CRUSTACEANS OF GENUS *ASELLUS*
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO VIII, 32 p., 2 tab., 8 fig., 40 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The thesis deals with the species delimitation of Eastern-European populations of isopod crustaceans of the genus *Asellus*. DNA was isolated from 54 specimens from 25 localities, and gene segments for COI and 28S rRNA were sequenced. The sequences obtained in this manner were used to create phylogenetic trees using the Bayesian approach. Phylogenetic analysis showed that the analysed specimens belonged to eight well supported clades that are mostly geographically separated. Majority of samples from Ukraine, southern and western Russia and Kazakhstan belonged to the nominotypic species *Asellus aquaticus*. In Ukraine, a genetically well separate sympatric population of water-lice is present, belonging to a new, as yet undescribed species. Samples from Georgia belonged to *A. monticola*, while samples from Iran were recognised as a separate clade that most probably represents a separate species as well. For comparison, our study also included a number of samples from northern and eastern Russia that belonged to *A. latifrons* and *A. levanidovorum* as well as two additional, phylogenetically closely related but geographically separate clades. Results indicate that the *Asellus* genus is characterized by cryptic diversity.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VI
	KAZALO SLIK	VII
	OKRAJŠAVE	VIII
1	UVOD	1
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	SISTEMATIKA IN RAZŠIRJENOST RODU <i>ASELLUS</i>	3
2.2	<i>ASELLUS AQUATICUS</i>	4
2.3	<i>ASELLUS MONTICOLA</i>	5
2.4	KRIPTIČNE VRSTE	6
2.5	MOLEKULSKA FILOGENIJA	6
2.5.1	Molekulska filogenija rodu <i>Asellus</i>	7
3	MATERIAL IN METODE	8
3.1	MATERIAL	8
3.2	METODE	11
3.2.1	Izolacija DNK	11
3.2.2	Pomnoževanje DNK v verižni reakciji s polimerazo (PCR)	12
3.2.3	Elektroforeza	15
3.2.4	Čiščenje DNK	16
3.2.5	Izdelava filogenetskih dreves	16
4	REZULTATI	18
4.1	FILOGENETSKA ANALIZA	18
4.2	ANALIZA VZORCEV RAZŠIRJENOSTI	21
5	RAZPRAVA	24
6	SKLEPI	26
7	POVZETEK	27
8	VIRI	29
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam osebkov in lokalitet analiziranih vodnih osličkov	9
Preglednica 2: Seznam referenčnih vzorcev in zunanjkov	10

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Asellus aquaticus aquaticus</i> in <i>Asellus aquaticus cavernicolus</i>	5
Slika 2: Zemljevid z označenimi lokacijami, kjer so bili nabrani vzorci, vključeni v raziskavo	8
Slika 3: Filogenetsko drevo podobnosti na podlagi gena COI po Bayesovi metodi	19
Slika 4: Filogenetsko drevo podobnosti na podlagi gena 28S rRNK po Bayesovi metodi	20
Slika 5: Mesta vzorčenja molekulsko analiziranih osebkov na območju Ukrajine in Rusije	21
Slika 6: Mesta vzorčenja molekulsko analiziranih osebkov na območju Gruzije, Irana in Kazahstana	22
Slika 7: Mesta vzorčenja molekulsko analiziranih osebkov na območju zahodne Rusije	22
Slika 8: Mesta vzorčenja molekulsko analiziranih osebkov na območju vzhodnoazijskega dela Rusije	23

OKRAJŠAVE

DNK	deoksiribonukleinska kislina
RNK	ribonukleinska kislina
PCR	polimerazna verižna reakcija (ang. polymerase chain reaction)
COI	citokrom oksidaza I
μl	mikroliter
bp	bazni par
dNTP	deoksiribonukleotidni trifosfat
TAE	tris-acetatni-EDTA puffer
EDTA	etilendiaminotetraična kislina
UV	ultravijolično
ml	mililiter
g	gram
V	volt

1 UVOD

Rod *Asellus* E. L. Geoffroy, 1762 je razširjen v Evropi in Aziji, kjer ima osrednji center vrstne diverzitete na Japonskem (Matsumoto, 1963). V Evropi v večjem delu območja živi le vrsta *Asellus aquaticus* Linnaeus, 1758. Pred kratkim je bila opisana nova vrsta *Asellus kosswigi* Verovnik, Prevorčnik & Jugovic, 2009, ki poseljuje podzemlje kraške reke Reke v Italiji in Sloveniji (Verovnik in sod., 2009; Konec in sod, 2016). Predvsem v slovenskem delu Dinaridov so morfološke lastnosti vrste *Asellus aquaticus* zelo variabilne zaradi aktivnega naseljevanja v jame (Turk in sod., 1996) (Slika 1).

A. aquaticus poseljuje tudi večji del Ukrajine, kjer pa je prisotna tudi genetsko in deloma morfološko povsem ločena populacija (Verovnik in sod., 2005), katere vrstna pripadnost še ni razrešena. Naprej proti vzhodu je na območju Kavkaza in Irana razširjena vrsta *Asellus monticola* Birštej, 1932 (Birštej, 1951; Henry in Magniez, 1996), v vzhodni Aziji pa še druge vrste iz tega rodu. Natančne meje razširjenosti *A. aquaticus* v vzhodni Evropi niso znane.

V nalogi smo skušali s pomočjo molekulskih analiz dveh neodvisnih molekulskih markerjev ugotoviti sorodstvene odnose med populacijami in vrstami iz rodu *Asellus* v vzhodnem delu Evrope (Ukrajini, Rusiji, Kavkazu, Iranu). Za primerjavo smo v analizo vključili tudi vrste, ki poseljujejo vzhodnoazijski del Rusije.

Molekulski markerji imajo številne prednosti pred morfološkimi znaki, saj so dostikrat selekcijsko nevtralni, univerzalni v smislu uporabnosti in razširjenosti med organizmi in jih lahko generiramo v velikem številu. Slednje je zelo pomemben dejavnik zlasti pri populacijskih raziskavah, kjer so morfološke razlike večinoma zelo majhne (Verovnik, 1998).

Delovne hipoteze, ki smo jih postavili, so sledeče:

- Območje vzhodne Evrope, Kavkaza in Irana poseljujejo tri vrste iz rodu *Asellus*.

- Vzorec iz severne Ukrajine, ki je bil vključen v predhodne raziskave, pripada ločeni, še neopisani vrsti iz rodu *Asellus*.
- Kavkaz predstavlja severno mejo razširjenosti *A. monticola*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SISTEMATIKA IN RAZŠIRJENOST RODU *ASELLUS*

Uvrstitev v sistem (Gruner, 1965):

razred CRUSTACEA

podrazred MALACOSTRACA Latreille, 1806

nadred PERACARIDA Calman, 1904

red ISOPODA Latreille, 1817

podred ASELLOTA Latreille, 1806

družina Asellidae Sars, 1897

rod *Asellus* E. L. Geoffroy, 1762

Rod *Asellus* je prvi opisal Etienne-Louis Geoffroy leta 1762 na podlagi vrste *Oniscus aquaticus* Linnaeus, 1758 (Sidorov in Prevorčnik, 2016). Izvorno gre za vzhodnoazijski rod, razširjen v sladkih vodah Palearktike (Henry in Magniez, 1970), ena vrsta je prisotna na Aljaski (Bowman in Holmquist, 1975). Glavni center vrstne pestrosti je Japonska, kjer je večina vrst stigobiotskih (Matsumoto, 1963).

Taksonomsko lahko vrste rodu *Asellus* razdelimo v dve evolucijski skupini (Henry in Magniez, 1995):

- Palearktično skupino »*aquaticus-hilgendorffii*« (= podrod *Asellus* = *Asellus* s. str.)
- Arktično sibirsko-aljaško skupino »*latifrons*« (= podrod *Arctasellus*)

Na ruskem Daljnem vzhodu in Japonskem otočju je bilo opisanih 17 vrst in podvrst podrodu *Asellus*. Na Japonskem je prisoten le en površinski in kar 8 troglobiotskih taksonov (Henry in Magniez, 1970), medtem ko je iz vzhodnoazijskega dela Rusije znan le troglobiotski *Asellus primoryensis* Henry & Magniez, 1993 in več površinskih taksonov: *A. levanidovorum* Henry & Magniez, 1995, *A. andreji* Vekhoff, 1994, *A. hilgendorffii hilgendorffii* Bovallius, 1886, *A. h. martynovi* Birštejn, 1947, *A. h. tshaunensis* Levanidov,

1980, *A. h. beringianus* Levanidov, 1980, *A. h. aculeiferus* Sidorov, 2005 in *A. h. amuricus* Sidorov, 2005 (Sidorov in Prevorčnik, 2016).

Za populacije na območju Evrope je dolgo veljalo, da pripadajo le vrsti *Asellus aquaticus* (Birštejn, 1951). V Ukrajini so raziskave pokazale, da je poleg *A. aquaticus* prisotna tudi genetsko in deloma morfološko ločena populacija (Verovnik in sod., 2005). Na območju Kavkaza in Irana je bila opisana vrsta *Asellus monticola* Birštejn, 1932 (Birštejn, 1951; Henry in Magniez, 1996).

2.2 ASELLUS AQUATICUS

Asellus aquaticus (Slika 1) je ekspanzivna zahodnopalearktična vrsta, ki se je uspešno razširila po večini Evrope (Henry in Magniez, 1983). Večji del areala poseljuje nominotipska podvrsta *A. a. aquaticus* (L.), na Balkanskem polotoku pa je znana obsežna vrstna diferenciacija (Verovnik in sod., 2003). Pri nas je bilo poleg nominotipske podvrste prepoznanih še šest podvrst, ki so omejene na Dinarski kras (Sket, 1994):

- *A. a. carsicus* Karaman, 1952
- *A. a. irregularis* Sket, 1965
- *A. a. longicornis* Sket, 1965
- *A. a. cyclobranchialis* Sket, 1965
- *A. a. carniolicus* Sket, 1965
- *A. a. cavernicolus* Racovitza, 1925

Troglomorfnu populacijo, ki živi v podzemnem delu reke Reke/Timave in so jo dolgo obravnavali kot podvrsto *A. a. cavernicolus* Racovitza, 1925 (Stammer, 1932; Stoch, 1984; Sket, 1994), so opisali kot ločeno vrsto *A. kosswigi* Verovnik, Prevorčnik & Jugovic, 2009 tako na osnovi njenih morfoloških kot tudi genetskih znakov (Prevorčnik in sod., 2004; Verovnik in sod., 2003, 2004, 2005).

A. aquaticus živi v različnih sladkovodnih habitatih, kot so reke, jezera, izviri in podzemne vode, ponekod pa poseljuje celo brakične vode (Gruner, 1965), kar povečuje njene zmožnosti razširjanja (Verovnik, 2003). Vrsta je visoko tolerantna na organsko

onesnaženje in je lahko indikator kvalitete vode (Whitehurst, 1991) ter predstavlja pomemben vir hrane za ptice in različne vrste rib (Pliszka, 1953; Rask in Hiisivuori, 1985; Petridis, 1990).



Slika 1: *Asellus aquaticus aquaticus* (zgoraj) in *Asellus aquaticus cavernicolus* (foto: Verovnik R.)

2.3 ASELLUS MONTICOLA

Za razliko od *A. aquaticus* je *A. monticola* stenotopična in endemična vrsta, ki je svoje območje razširjenosti dosegla pred ekspanzijo *A. aquaticus* po Evropi (Henry in Magniez, 1996). Opisana je bila iz izvira na gori Satapli, blizu mesta Kutaisi v Gruziji. Razširjena je v Armeniji, Gruziji, Iranu (Birštej, 1951). Njeno domnevno življenjsko okolje so višinska jezera in reke goratih območij na meji Turčije, Gruzije, Armenije in Irana (Henry in Magniez, 1996).

2.4 KRIPTIČNE VRSTE

O kriptičnih vrstah govorimo, ko sta dve ali več vrst obravnavani kot ena na podlagi medsebojne morfološke podobnosti. Velike genetske razdalje znotraj tradicionalno prepoznanih vrst, pogosto v kombinaciji z minimalnimi razlikami v morfologiji, razširjenosti in drugimi razlikami, so razkrile obstoj kriptičnih vrst pri večini organizmov in v različnih tipih habitatov (Bickford in sod., 2007). Vsak nov rod in vsak na novo koloniziran habitat ima lahko svojo stopnjo in vzorec kriptične diverzitete, ki zahteva specifično raziskavo in varstveni pristop (Trontelj in Fišer, 2009).

Glede na pogostost odkrivanja kriptičnih vrst na podlagi DNK sekvenc, kar naknadno pogosto potrdijo še morfološki in/ali ekološki znaki, bi morali začeti molekulske znake vključevati v alfa taksonomijo (opisovanje in poimenovanje novih vrst) in rutinsko shranjevati genetski material vzorcev novo odkritih vrst, da bi bile možne naknadne analize (Bickford in sod., 2007).

2.5 MOLEKULSKA FILOGENIJA

Filogenetske analize večinoma temeljijo na molekulskih markerjih, čeprav zanje lahko uporabimo katerikoli set filogenetsko informativnih znakov (Avice, 2000). Zaradi primerne dolžine ter prisotnosti evolucijsko ohranjenih in variabilnih delov gena so zanje najuporabnejši geni, povezani z univerzalnimi življenjskimi procesi, npr. sintezo proteinov in celičnim dihanjem (Dover in Tautz, 1986).

Različni molekularski markerji se spreminjajo različno hitro, zato je za različne namene uporabe pomembno izbrati marker s primerno stopnjo substitucij. Za razlikovanje ozko sorodnih vrst je potreben gen z visoko stopnjo substitucij, ki zagotavlja, da se je v kratkem času, v katerem se je takson razvijal, nabralo dovolj mutacij (Cruickshank, 2002).

Med bolj znanimi molekularskimi markerji so: nekodirajoče intragenske regije (ITS2, ITS1), mitohondrijski geni (16S rRNK, 12S rRNK, COI, COIII), jedrni ribosomalni geni (5.8S rRNK, 18S rRNK, 28S rRNK) ter jedrni protein-kodirajoči geni (Cruickshank, 2002).

Pogosteje uporabljeni molekularni markerji v filogenetskih in filogeografskih raziskavah so različni deli mitohondrijske DNK. Prednost mitohondrijske DNK pred jedrno je zlasti v klonalnem načinu dedovanja in posledični odsotnosti rekombinacije. Spremembe genetskega zapisa so tako izključno posledica vertikalno prenesenih mutacij, kar omogoča jasnejši vpogled v sorodstvene odnose med osebki. Mitohondrijska DNK je tudi bolj podvržena mutacijam in ima zato večjo hitrost evolucije (Avise, 2000). Mitohondrijski DNK genotipi, ki se imenujejo haplotipi, se med seboj razlikujejo po posameznih mutacijah, nakopičenih od zadnjih ženskih skupnih prednikov. Zaradi hitre dinamike evolucije mitohondrijske DNK, znotraj vrste navadno obstaja veliko različnih haplotipov hkrati (Avise, 2009).

Tudi jedrni ribosomalni geni se v veliki meri uporabljajo v molekularni filogeniji, pogosto za ugotavljanje globlje ravni filogenije (Cruickshank, 2002). 28S rRNK je najbolj variabilen del jedrnih rRNK genov, ki so sicer na drugih delih visoko konzervativni (Verovnik in sod., 2005).

2.5.1 Molekularna filogenija rodu *Asellus*

Dosedanje raziskave, ki so vključevale metode molekularne filogenije, so se ukvarjale z ugotavljanjem odnosov med jamskimi in površinskimi populacijami *A. aquaticus* (Verovnik in sod., 2003, 2004) in njihovim izvorom ter filogeografijo na Dinarskem Krasu Slovenije in v Evropi (Verovnik, 2003; Verovnik in sod., 2005).

Verovnik in sod. (2009) so na podlagi genetskih in morfoloških razlik opisali novo vrsto *A. kosswigi*, ki je prva opisana troglomorfna vrsta tega rodu v Evropi.

Filogeografijo vodnega oslička na širšem območju Evrope so raziskovali tudi Sworobowicz in sod. (2015) ter ugotovili, da so genetsko najbolj raznolike populacije *A. aquaticus* na območju okrog Jadranskega morja in Alp ter na jugovzhodu Balkanskega polotoka. Nasprotno pa najmanj raznolike populacije naseljujejo srednjo in severovzhodno Evropo. Drugo območje z omejeno genetsko pestrostjo so severozahodne Alpe. Zahodna Evropa in Črnomska regija sta po stopnji raznolikosti nekje vmes.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

V analizo smo vključili 54 osebkov rodu *Asellus* iz 25 lokalitet (Slika 2 in Preglednica 1). Če je bilo mogoče, smo z vsake lokalitete analizirali po dva osebka. Vzorce, ki smo jih uporabili za raziskave, so nabrali sodelavci Katedre za zoologijo in zunanji sodelavci v času med 16. 8. 2006 in 21. 7. 2012. Do izolacije DNK so bili vzorci shranjeni v 96 % etanolu pri -20 °C. Vsi vzorci in ostanki analiziranih živali so shranjeni v zbirki Katedre za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Kot referenčne vzorce in zunanjsike smo vključili še nukleotidna zaporedja drugih vzorcev, ki so bili analizirani že prej (Verovnik in sod., 2005) (Preglednica 2).



Slika 2: Zemljevid z označenimi lokacijami, kjer so bili nabrani vzorci, vključeni v raziskavo (prirejeno po Google Earth). Številke označujejo kode lokacij, ki so podrobneje opisane v Preglednici 1.

Preglednica 1: Seznam osebkov in lokalitet analiziranih vodnih osličkov. ID = koda lokacije.

Kode osebkov	ID	Lokacija vzorčenja	Država	Koordinate	Datum
AA846–AA849	1	Saholan Cave, Mahabad	Iran	36°40'N / 45°58'E	2012
AA982–AA983	2	jezero Tabatskuri	Gruzija	41°38'43.66"N / 43°37'33.93"E	23. 5. 2010
AA984–AA985	3	Simferopol, iztočnik pod TN univerzo	Ukrajina	44°56'11.00"N / 34° 8'3.79"E	16. 8. 2006
AA986–AA987	4	Južny Bug, Kuribčino, Nikolajev	Ukrajina	46°58'54.37"N / 31°58'7.40"E	27. 7. 2009
AA988–AA989	5	Černigov	Ukrajina	51°29'52.24"N / 31°17'21.10"E	maj 2009
AA990–AA991	6	Knjaze – Volkonskoe, Habarovsk	Rusija	48°27'49.97"N / 135°27'0.96"E	15. 9. 2009
AA992–AA993	7	Zoološki vrt, Harkiv	Ukrajina	50° 0'10.91"N / 36°13'29.16"E	9. 9. 2007
AA994–AA995	8	Suhaja rečka, Sevastopol	Ukrajina	44°36'55.84"N / 33°31'28.21"E	2. 5. 2009
AA996	9	reka Dnestr, Bjelajevka	Ukrajina	46°27'51.59"N / 30°12'36.01"E	12. 6. 2009
AA998–AA999	10	potok Derekojka, Jalta	Ukrajina	44°30'35.1"N / 34°10'09.1"E	23. 8. 2006
AB001–AB002	11	reka Vodopadnaja, Jalta	Ukrajina	44°29'23.50"N / 34°08'37.40"E	23. 8. 2006
AB003–AB004	12	Tymshaly spring, Tushikuduk	Kazahstan	44°36'0550"N / 50° 35'4770"E	12. 8. 2009
AB005–AB006	13	Veliki Burluk	Ukrajina	50° 2'41.36"N / 37°23'25.58"E	9. 9. 2007
AB007–AB008	14	Gorelaja dolina, Kharkovskaja obl.	Ukrajina	49° 38'N / 36°32'E	16. 4. 2009
AB009	15	reka Ičenka, Belgorod	Rusija	50°35'57.84"N / 36°34'41.20"E	april 2009
AB012–AB013	16	reka Ob, Labytnangi	Rusija	66°38'851"N / 66°30'4870"E	22. 7. 2011
AB015–AB016	17	reka Pivdennyi, Mykolayiv	Ukrajina	46°58'23.28"N / 31°59'32.15"E	22.-30.6.2011
AB017–AB018	18	kanal Čajka, Hola Prystan	Ukrajina	46° 32' 21,5" N / 32° 33' 12,7" E	24. 10. 2011
AB019–AB020	19	vodnjak, Biliaivka	Ukrajina	46° 29' 35,7" N / 30° 12' 24,3" E	27. 10. 2011
AB021–AB022	20	iztočni potok, Stara Zburovka,	Ukrajina	46° 27' 43,5" N / 32° 21' 27,8" E	21. 10. 2011
AB023–AB024	21	potoček pod cesto, Biliaivka	Ukrajina	46° 29' 26,3" N / 30° 11' 39,2" E	27. 10. 2011
AB027–AB028	18	kanal Čajka, Hola Prystan	Ukrajina	46° 32' 21,5" N / 32° 33' 12,7" E	25. 10. 2011

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 1: Seznam osebkov in lokalitet analiziranih vodnih osličkov. ID = koda lokacije.

Kode osebkov	ID	Lokacija vzorčenja	Država	Koordinate	Datum
AB029	22	reka Turunčuk, Biliaivka	Ukrajina	46° 28' 5,5" N / 30° 11' 25,8" E	27. 10. 2011
AB030–AB031	17	reka Pivdennyi, Mykolayiv	Ukrajina	46°58'23.28"N / 31°59'32.15"E	22.-30.6.2011
AB034–AB035	23	reka Pišinka, pritok jez. Sterž, blizu izliva Volge	Rusija	57°13'N / 32°35'E	7. 8. 2007
AB036–AB038	24	jezero Khanka	Rusija	44°51'N / 132°26'E	21. 7. 2012
AB043–AB044	25	reka Basin, Khabarovsk	Rusija	48°28'57.11"N / 135° 4'39.27"E	5. 6. 2009

Preglednica 2: Seznam referenčnih vzorcev (iz Verovnik in sod., 2005) in zunanjkov*.

Kode osebkov	Vrsta	Država
MD1	<i>Asellus aquaticus</i>	Romunija
RO5	<i>A. aquaticus</i>	Romunija
MA4	<i>A. aquaticus</i>	Romunija
AA1	<i>A. aquaticus</i>	Danska
UP3	<i>A. aquaticus</i>	Švedska
AL4	<i>A. aquaticus</i>	Švedska
NO2	<i>A. aquaticus</i>	Norveška
PL2	<i>A. aquaticus</i>	Poljska
HK	<i>Asellus</i> sp.	Ukrajina
HK1	<i>Asellus</i> sp.	Ukrajina
HK2	<i>Asellus</i> sp.	Ukrajina
HK3	<i>Asellus</i> sp.	Ukrajina
HK4	<i>Asellus</i> sp.	Ukrajina
UA	<i>Asellus</i> sp.	Ukrajina
UA1	<i>Asellus</i> sp.	Ukrajina
UA2	<i>Asellus</i> sp.	Ukrajina
IR1	<i>Asellus</i> sp.	Iran
LB	<i>A. kosswigi</i>	Italija
KOKR	<i>A. aquaticus</i>	Slovenija
PPJL	<i>A. aquaticus</i>	Slovenija
ZBVP	<i>A. aquaticus</i>	Slovenija
EUR1	<i>A. aquaticus</i>	Evropa
EUR2	<i>A. aquaticus</i>	Evropa
PS	<i>A. aquaticus</i>	Makedonija
BO	<i>A. aquaticus</i>	Hrvaška
SN	<i>A. aquaticus</i>	Grčija
JP2*	<i>A. hilgendorffii</i> *	Japonska
PA4*	<i>Proasellus coxalis</i> *	Slovenija
PA5*	<i>Proasellus coxalis</i> *	Slovenija
BA4*	<i>Baikaloasellus</i> sp.*	Rusija

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija DNK

DNK smo izolirali s kompletom »GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit« (Sigma-Aldrich, ZDA). Pod stereomikroskopom smo vzorčnim živalim odstranili po dve nogi, po možnosti 6. par, ostanek živali pa shranili v 96 % etanolu za nadaljnje morfološke analize. Po rokovanju z vsakim vzorcem smo secirno orodje sprali v 96 % etanolu in ga obrisali s papirnato brisačko. S tem smo preprečili navzkrižno kontaminacijo vzorcev.

Protokol:

- Dve nogi vzorčne živali damo v primerno označeno mikrocentrifugirko. Vzorcetu dodamo 180 µl raztopine Lysis T.
- S pomočjo macerirne palčke vzorec maceriramo, da mehansko razpade. Pazimo, da pred maceriranjem vsakega vzorca palčko speremo v 96 % etanolu.
- Dodamo 20 µl proteinaze K in inkubiramo v stresalniku pri 55 °C uro in pol.
- Na hitro scentrifugiramo, da spravimo kapljice s pokrovčka.
- Dodamo 20 µl RNaze A. Malce pomešamo in inkubiramo 10 minut na sobni temperaturi.
- Dodamo 200 µl raztopine Lysis C in inkubiramo v stresalniku na 70 °C 10 min.
- V posebno mikrocentrifugirko (iz kompleta) damo po 500 µl raztopine Column Preparation. Centrifugiramo 1 min na 12000 obratih, nato odlijemo, kar gre skozi.
- V mikrocentrifugirko z vzorcem dodamo 200 µl hladnega 96 % etanola. Z vorteksom premešamo in prelijemo v prej pripravljeno mikrocentrifugirko s filtrom.
- Centrifugiramo 1 min na 14000 obratih.
- Supernatant odlijemo. Kolono s filtrom prestavimo v novo mikrocentrifugirko.
- Dodamo 500 µl Wash solution in centrifugiramo 1 min na 6900 obratih.
- Supernatant odlijemo in kolono prestavimo v novo mikrocentrifugirko.
- Ponovno odpipetiramo 500 µl Wash solution v mikrocentrifugirko.
- Centrifugiramo 3 min na 14000 obratih. Supernatant odlijemo in ponovno centrifugiramo 2 min na 14000 obratih.

- Supernatant odlijemo, kolone s filtrom pa prestavimo v novo mikrocentrifugirko.
- Dodamo 30 µl Elution solution in počakamo 10 min, da se filter omoči.
- Centrifugiramo 1 min na 6900 obratih.
- Ponovno dodamo 30 µl Elution solution in centrifugiramo 1 min na 6900 obratih.
- Ponovno dodamo 30 µl Elution solution in centrifugiramo 1 min na 12000 obratih.
- Odstranimo kolone, supernatant pa shranimo v zamrzovalnik, da ga lahko uporabimo za nadaljnje delo.

3.2.2 Pomnoževanje DNK v verižni reakciji s polimerazo (PCR)

V verižni reakciji s polimerazo smo pomnoževali 656 baznih parov (bp) dolgo sekvenco mitohondrijskega gena za citokrom oksidazo I (COI) in 807 bp dolgo sekvenco jedrnega gena za 28S ribosomsko podenoto (28S rRNK).

Sestava 15 µl reakcije:

- 11,1 µl H₂O
- 1,5 µl PCR-pufra
- 1,5 µl dNTP
- 0,2 µl začetnega oligonukleotida 1
- 0,2 µl začetnega oligonukleotida 2
- 0,07 µl Taq- polimeraze
- 1 µl vzorčne DNK

To kombinacijo kemikalij in razmerja med njimi smo uporabili v vseh reakcijah, ki smo jih izvajali. Poleg tega smo 1 volumen te mešanice pripravili za slepi vzorec, ki je služil kot kontrola.

Začetna oligonukleotida za odsek gena za COI (Folmer in sod., 1994):

LCO 1490 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTG-3'

HCO 2198 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAT-3'

Začetna oligonukleotida za odsek gena za 28S rRNK (Verovnik in sod., 2005):

28S lev2 5'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTT-3'

SR test2 5'-AGGGAAACTTCGGAGGGGAACC-3'

Program PCR za pomnoževanje z začetnima oligonukleotidoma LCO/HCO:

95 °C	4 min	
95 °C	1 min	} 40 x
45 °C	1 min	
72 °C	2 min 30 s	
72 °C	7 min	

Reakcije PCR pri nekaterih vzorcih niso uspeli in zanje smo reakcijo ponovili z modifikacijo nastavitvev. Dodali smo dva cikla in hibridizacijo na 2 °C nižji temperaturi. V reakcijo smo dali več dNTP in več polimeraze.

Modificirana sestava 15 µl reakcije:

- 10,8 µl H₂O
- 1,5 µl PCR-pufra
- 1,8 µl dNTP
- 0,2 µl začetnega oligonukleotida 1
- 0,2 µl začetnega oligonukleotida 2
- 0,07 µl Taq- polimeraze + 10 %
- 1 µl vzorčne DNK

Takšno sestavo reakcije smo uporabili za vzorce AB004, AB012, AB013 in AA848–AA849. Za slednja vzorca smo naredili 30 µl reakcijo, ker smo pri teh delali izolacijo DNK iz gela.

Modificiran program PCR za pomnoževanje z začetnima oligonukleotidoma LCO/HCO:

95 °C	4 min		
95 °C	1 min	}	42 x
43 °C	1 min		
72 °C	2 min 30 s		
72 °C	7 min		

Za vzorce AA846-AA849 smo poskusili narediti tudi PCR reakcijo za COI z ročno oblikovanimi začetnimi oligonukleotidi, ki so nam jih naredili po naročilu:

IR1 5'-TAGTAATAGCHCCGGCTAANACGGG-3'

IR3 5'-CNTGATCAGGNAGAGCAGGNACTGC-3'

Program PCR za pomnoževanje z začetnima oligonukleotidoma IR1/IR3:

95 °C	4 min		
95 °C	1 min	}	30 x
56 °C	1 min		
72 °C	1 min		
72 °C	7 min		

Program PCR za pomnoževanje z začetnima oligonukleotidoma 28S lev2/SR test2:

94 °C	3 min		
94 °C	45 s	}	36 x
47 °C	30 s		
72 °C	1 min 45 s		
72 °C	3 min		

Za vzorce AA982-AA983, AB006, AB009, AB017-AB020, AB029, AB030 in AB034-AB035 smo naredili 30 µl reakcijo, ker smo pri njih delali izolacijo DNK iz gela. To smo naredili po protokolu GenJET Gel Extraction Kit. Pripravili smo 1,5 % agarozni gel, na katerega smo dali vseh 30 µl iz PCR reakcije. Pustili smo, da je elektroforeza tekla malo več kot uro in pol in nato pod UV lučjo označili, kateri del gela moramo izrezati.

Za vzorce AA989, AA994, AA998, AB001, AB024 in AB031 smo naredili 45 μ l reakcijo, v katero smo dali 2 μ l vzorčne DNK in nato ravno tako naredili izolacijo DNK iz gela.

Količino pomnoženega fragmenta smo po vsakem pomnoževanju preverili z elektroforezo v 1 % agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom v 1x pufri TAE.

3.2.3 Elektroforeza

Z elektroforezo smo preverjali PCR reakcijo. Najprej smo pripravili agarozni gel.

Postopek priprave gela:

- V erlenmajerici zmešamo 1 g agaroze s 100 ml 1xTAE-pufra.
- Erlenmajerico s sestavinami za gel segrevamo v mikrovalovni pečici, dokler se vsa agarosa ne raztopi.
- Erlenmajerico postavimo na magnetno mešalo, da se gel meša in počasi ohlaja.
- V pipeto pripravimo 2 μ l etidijevega bromida in ga hkrati z gelom vlijemo v elektroforezno banjico. Hkrati mešamo s pipeto, da se etidijev bromid enakomerno razporedi. Pazimo, da v gelu ni mehurčkov, ki bi lahko kasneje pri elektroforezi ovirali potovanje molekul DNK.
- Dodamo glavniček in pustimo v digestoriju vsaj 1 uro, da se gel strdi in popolnoma ohladi.
- Odstranimo glavniček in plastične pregrade.

Postopek elektroforeze:

- V banjico z gelom nalijemo 1xTAE-pufer, da v celoti prekrije gel.
- S pipeto odmerimo 5 μ l vzorca, pomnoženega s postopkom PCR, ga pomešamo s kapljico Loading-pufra in mešanico nanesimo na gel. Postopek ponovimo za vse vzorce, pri čemer menjamo nastavke za pipetiranje, da ne pride do kontaminacije.
- V zadnjo luknjico na gelu damo 1,75 μ l lestvice (mešanice 100 baznih parov).
- Banjico pokrijemo s pokrovom in jo priklopimo na napetost 48 V za približno 45 minut.

- Ko izklopimo napetost, odstranimo pokrov, odlijemo TAE-pufer in splaknemo z vodo.
- Banjico z gelom odnesemo do UV-kamere, s katero slikamo gel in tako preverimo, če je v vzorcu zadostna količina DNK. Na sliki je DNK vidna kot svetleča črtica. Bolj kot je očitna, več DNK je v vzorcu.

3.2.4 Čiščenje DNK

Vzorci, ki so po postopku PCR imeli dovolj veliko koncentracijo DNK, smo očistili, preden smo jih poslali na sekvenciranje.

Po izvedbi elektroforeze je ostalo približno 10 µl vsakega vzorca in tem smo dodali 0,2 µl eksonukleaze in 1 µl alkalne fosfataze. Čiščenje je potekalo v napravi PCR.

Program čiščenja:

37 °C 45 min

80 °C 15 min

Vzorci smo poslali na sekvenciranje v podjetje Macrogen (Seul, Južna Koreja) in nazaj prejeli sekvence v elektronski obliki.

3.2.5 Izdelava filogenetskih dreves

Za vsak vzorec smo dobili sekvence iz obeh smeri branja v formatu .ab1. V programu ChromasPro 1.5 smo odprli obe datoteki za posamezen vzorec in ju združili v komplementarno sekvenco. To smo shranili v formatu .gpj. Nato smo sekvenco vsakega vzorca skopirali v program NotePad in tako dobili vsa zaporedja nukleotidov, ki se pojavljajo v vzorcih.

Poleg sekvenc naših vzorcev smo dodali še nekaj sekvenc vzorcev za primerjavo (seznam teh vzorcev je v Preglednici 2).

Zaporedja sekvenc smo poravnali s programom Muscle 3.8.31 (Edgar, 2004). Iz poravnave so bila razvidna odstopanja in napake, ki so nastale pri sekvenciranju. Nekatere napake smo ročno popravili v programu BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999). Urejene sekvence smo shranili v formatu .fasta.

Preden smo začeli z Bayesovo analizo, smo si pomagali s preliminarnimi filogenetskimi drevesi, narejenimi po metodi povezovanja sosedov (neighbour joining), da bi videli, kakšna je topologija drevesa. To smo naredili v programu MEGA 5.01 (Kumar in sod., 2011).

Datoteko .fasta smo nato uvozili v program Model Generator, ki za izbrani niz podatkov preverja ustreznost različnih modelov evolucije in izbere najprimernejšega. Program je za analizo sekvenc 28S predlagal model: GTR + I + G, za sekvence COI pa HKY + G.

V programu ALTER smo datoteko .fasta pretvorili v format .nexus, ki se uporablja pri Bayesovi analizi.

Bayesovo drevo filogenetskih odnosov smo iskali s programom MrBayes 3.2.2. Pri obeh nizih podatkov smo uporabili 6 diskretnih kategorij porazdelitve γ . Število generacij smo nastavili na 2.000.000. Prvih 5000 dreves smo izbrisali, iz ostalih pa sestavili končno filogenetsko drevo. Vrednosti na vejah so posteriorne verjetnosti, ki nam prikazujejo statistično podporo kladov.

S programom FigTree 1.4 (Rambaut, 2006) smo odprli dobljeno datoteko. Za urejanje drevesa smo uporabili program CorelDraw X7.

4 REZULTATI

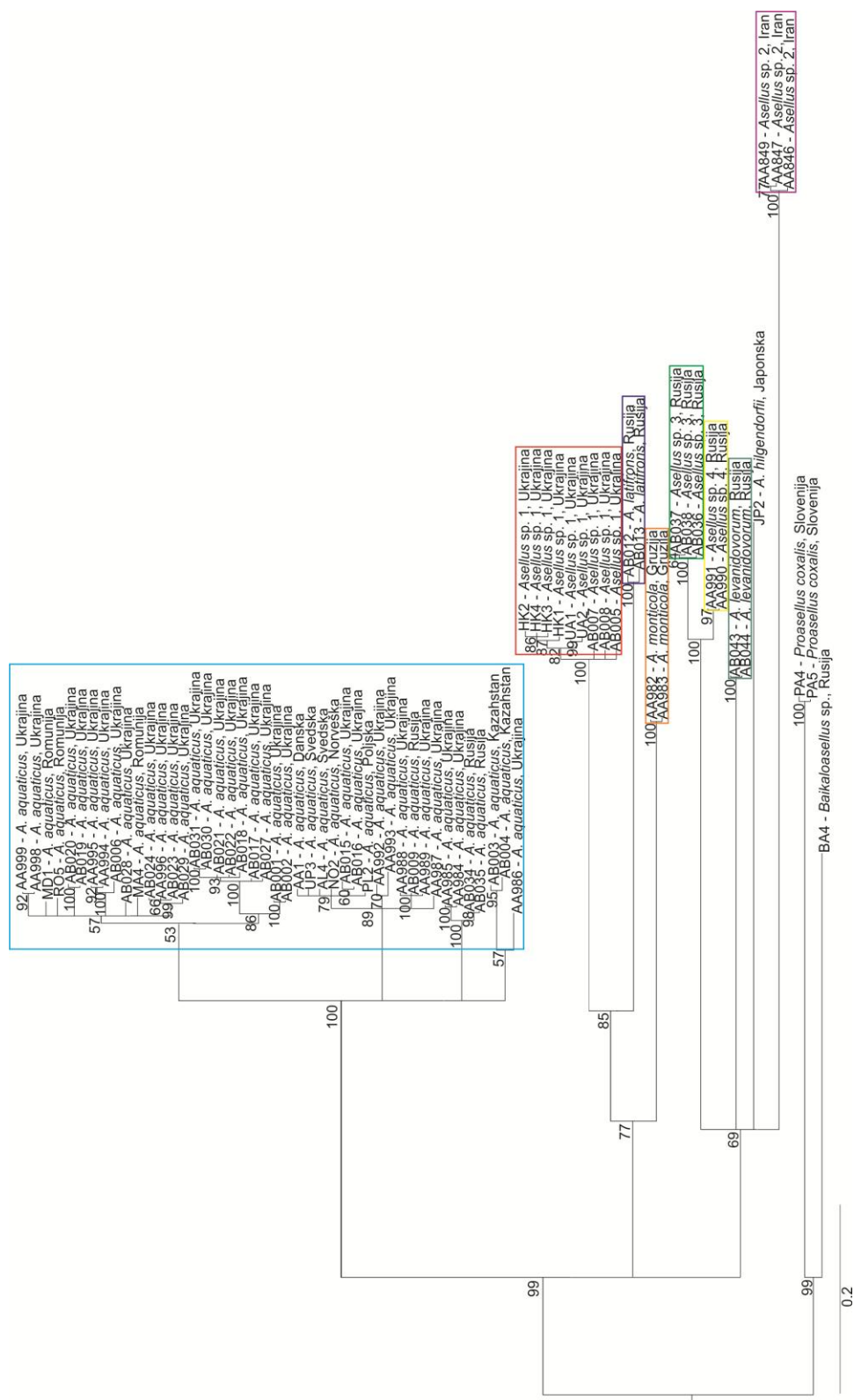
4.1 FILOGENETSKA ANALIZA

Analizirali smo 54 vzorcev iz 25 lokalitet, za primerjavo pa smo v analizo vključili še sekvence skupno 30 referenčnih vzorcev in zunanjkov, ki so bili že predhodno analizirani. Na filogenetskih drevesih so se vzorci razporedili v 8 relativno dobro podprtih kladov (Sliki 3 in 4):

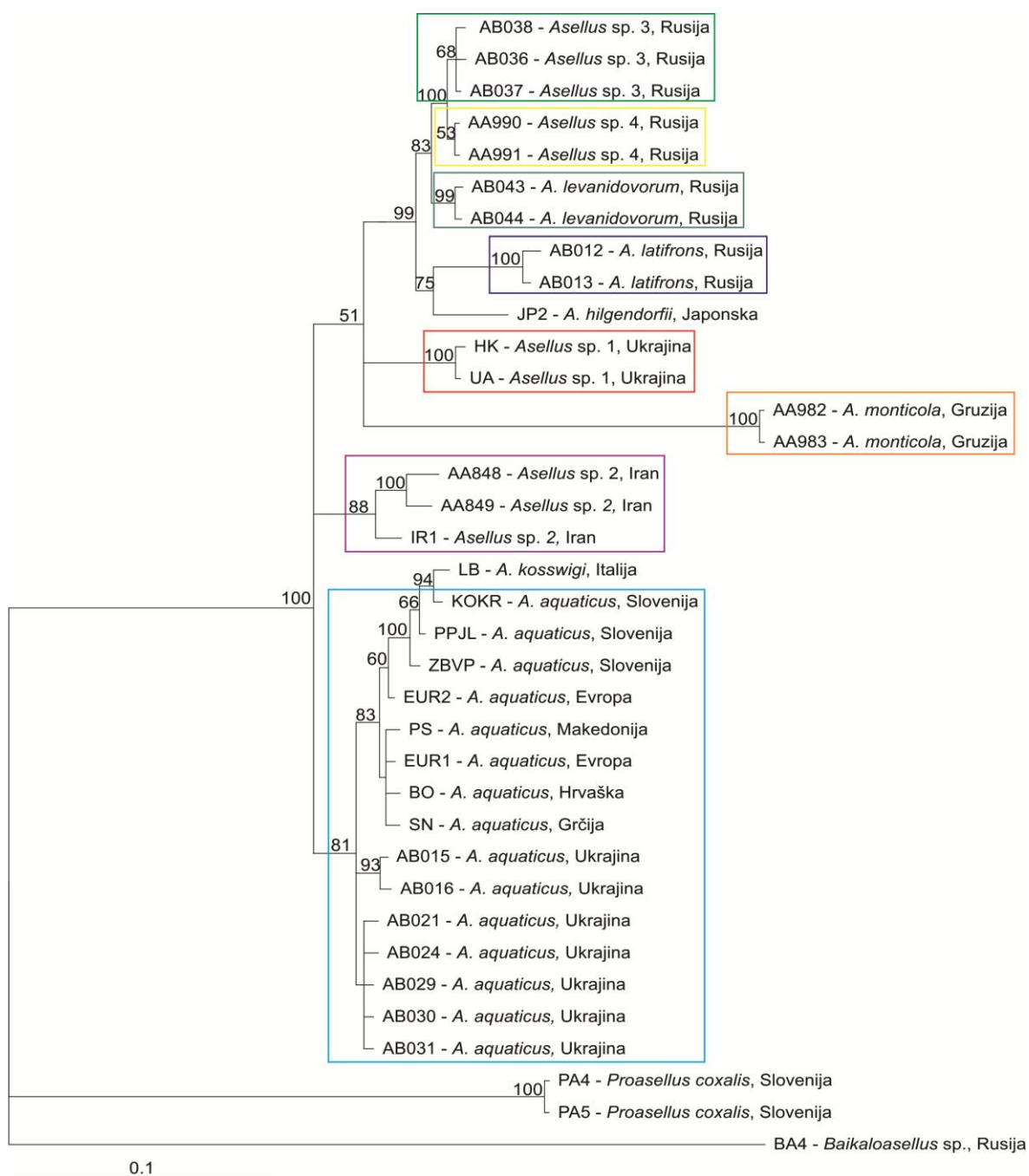
- *A. aquaticus*: tej vrsti pripada največ analiziranih vzorcev, ki so z območja Ukrajine, Rusije, Kazahstana in tudi referenčni vzorci iz različnih drugih koncev Evrope (na slikah obrobljeni svetlo modro)
- *A. latifrons*: vzorca iz severne Rusije (na slikah obrobljena temno modro)
- *A. monticola*: vzorca iz Gruzije (na slikah obrobljena oranžno)
- *A. levanidovorum*: vzorca iz vzhodnoazijskega dela Rusije (na slikah obrobljena temno zeleno)
- *Asellus* sp. 1: neopisana vrsta iz Ukrajine (na slikah obrobljena rdeče)
- *Asellus* sp. 2: vzorci iz Irana (na slikah obrobljeni vijolično)
- *Asellus* sp. 3: vzorci iz vzhodnoazijskega dela Rusije (na slikah obrobljeni svetlo zeleno)
- *Asellus* sp. 4: vzorca iz vzhodnoazijskega dela Rusije (na slikah obrobljena rumeno)

Kladi najverjetneje ustrezajo sedmim različnim vrstam, od katerih so nekatere znane in opisane, nekatere pa še ne.

Vzorci iz vzhodnoazijskega dela Rusije so na obeh genskih drevesih (Sliki 3 in 4) zelo blizu skupaj, torej gre za ozko sorodna taksona, sorodstveni odnosi med njima pa niso razjasnjeni.



Slika 3: Filogenetsko drevo podobnosti na podlagi gena COI po Bayesovi metodi. Številke prikazujejo posterioorne verjetnosti oz. statistično podporo kladov izraženo v %. Prikazane so le podpore, ki so višje od 50 %. Merilo prikazuje razmerje števila substitucij z dolžino vej.

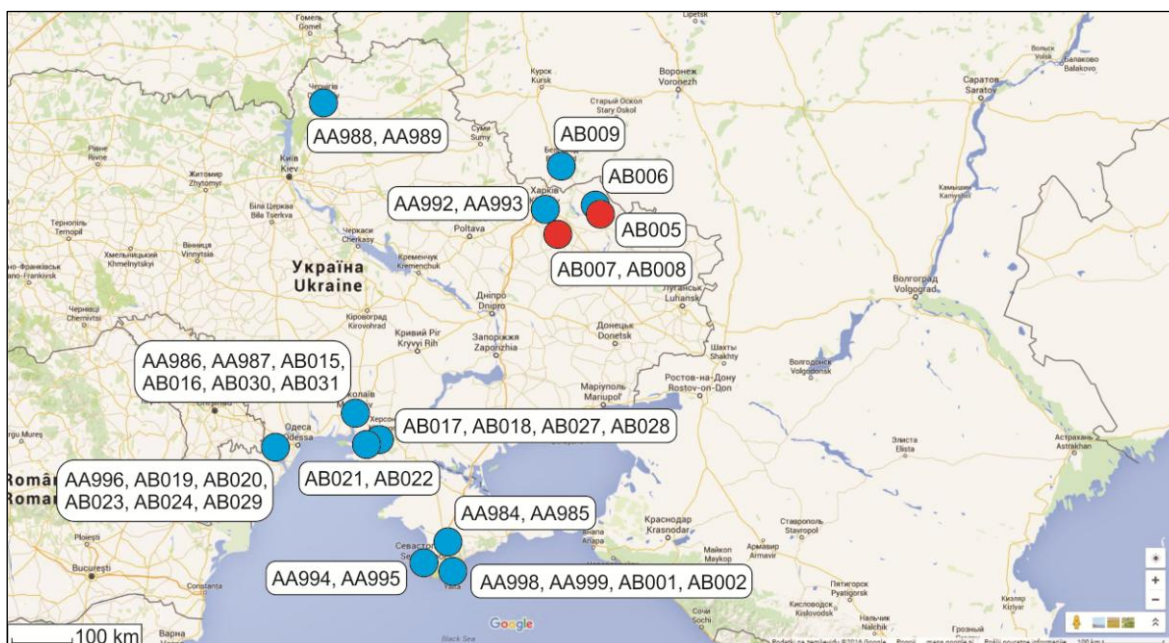


Slika 4: Filogenetsko drevo podobnosti na podlagi gena 28S rRNK po Bayesovi metodi. Številke prikazujejo posteriorne verjetnosti oz. statistično podporo kladov izraženo v %. Prikazane so le podpore, ki so višje od 50 %. Merilo prikazuje razmerje števila substitucij z dolžino vej.

4.2 ANALIZA VZORCEV RAZŠIRJENOSTI

Lokalitete analiziranih vzorcev smo poiskali na zemljevidu in z barvami označili pripadnost različnim kladom oz. skupinam haplotipov.

Analizirani vzorci, ki so bili nabrani na območju Ukrajine in jugozahodnega dela Rusije, so se na filogenetskem drevesu podobnosti večinoma uvrstili v klad, ki predstavlja vrsto *Asellus aquaticus* (Slika 5; svetlo modra). Nekaj vzorcev iz severovzhodne Ukrajine se je uvrstilo v ločeno skupino haplotipov, ki verjetno predstavlja ločeno, še neopisano vrsto (Slika 5; rdeča).

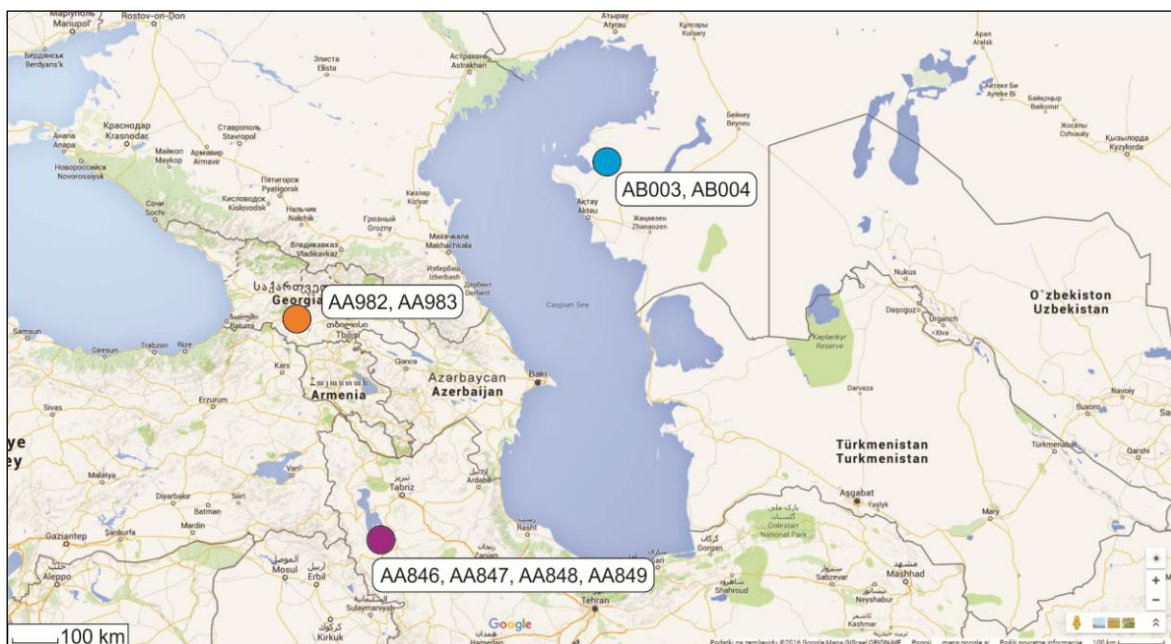


Slika 5: Mesta vzorčenja molekularno analiziranih osebkov na območju Ukrajine in Rusije (prirejeno po Google Maps). Barve označujejo pripadnost in se ujemajo s kladi iz filogenetske analize.

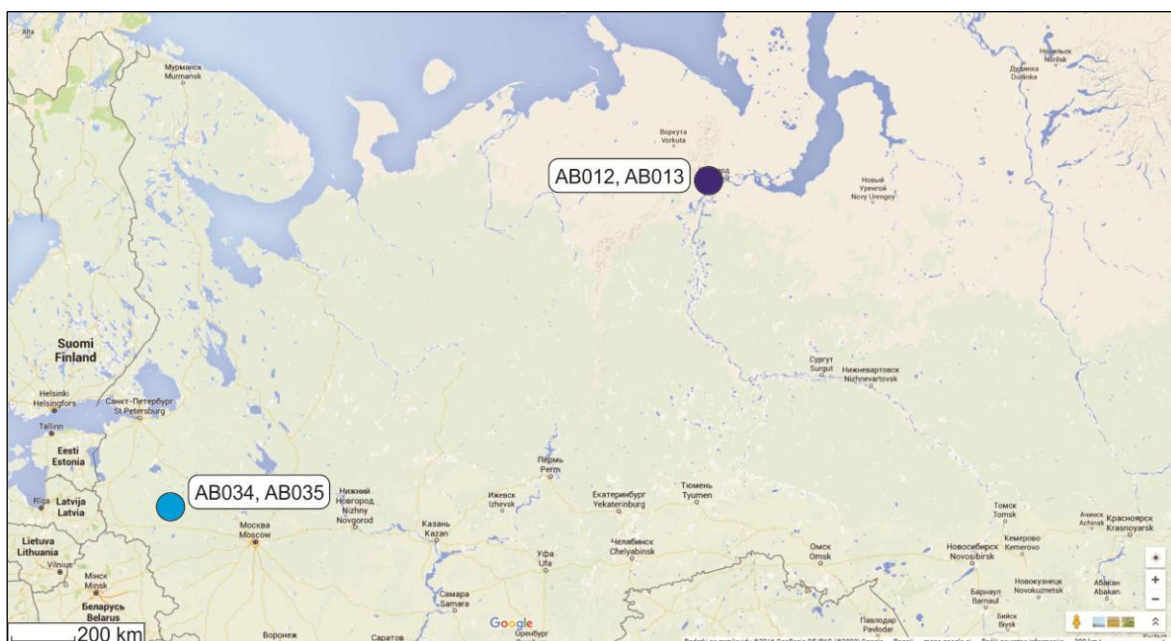
Analizirani vzorci iz Gruzije pripadajo vrsti *Asellus monticola* (Slika 6; oranžna). Vzorca iz Irana so se na filogenetskem drevesu uvrstili v ločen klad, ki verjetno predstavlja ločeno vrsto (Slika 6; vijolična). Vzorca iz Kazahstana pripadata kladu vrste *Asellus aquaticus* (Slika 6; svetlo modra).

Vzorca iz zahodnega dela Rusije prav tako pripadata vrsti *Asellus aquaticus* (Slika 7; svetlo modra), vzorca iz severnega dela Rusije pa sta se na filogenetskem drevesu podobnosti uvrstila v klad, ki predstavlja vrsto *Asellus latifrons* (Slika 7; temno modra).

Bevk I. Ugotavljanje vrstne pripadnosti populacij izopodnih rakov iz rodu *Asellus* v vzhodni Evropi.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 2016



Slika 6: Mesta vzorčenja molekulsko analiziranih osebkov na območju Gruzije, Irana in Kazahstana (prirejeno po Google Maps). Barve označujejo pripadnost in se ujemajo s kladi iz filogenetske analize.



Slika 7: Mesta vzorčenja molekulsko analiziranih osebkov na območju zahodne Rusije (prirejeno po Google Maps). Barve označujejo pripadnost in se ujemajo s kladi iz filogenetske analize.

Vzorci iz vzhodnoazijskega dela Rusije so se na filogenetskem drevesu podobnosti uvrstili v tri skupine haplotipov. Ena skupina predstavlja vrsto *Asellus levanidovorum* (Slika 8; temno zelena). Drugi dve skupini haplotipov sta se na obeh filogenetskih drevesih uvrstili zelo blizu skupaj (Slika 3 in 4), torej gre za ozko sorodna taksona, ki pa sta geografsko ločena (Slika 8; rumena in svetlo zelena).



Slika 8: Mesta vzorčenja molekulsko analiziranih osebkov na območju vzhodnoazijskega dela Rusije (prirejeno po Google Maps). Barve označujejo pripadnost in se ujemajo s kladi iz filogenetske analize.

5 RAZPRAVA

Filogenetske odnose med populacijami izopodnih rakov iz rodu *Asellus* smo ugotavljali na podlagi zaporedij mitohondrijskega gena za citokrom oksidazo I (COI) in jedrnega gena za 28S rRNK. V nekaterih primerih kljub optimizacijam postopkov in večkratnim ponovitvam iz izolirane DNK nismo uspeli pomnožiti obeh genov. Vzrok za to je bila verjetno poškodovana izolirana DNK. Nabora vzorcev v filogenetskih analizah za posamezna gena se zato nekoliko razlikujeta.

Z Bayesovo analizo dveh neodvisnih genetskih markerjev smo dobili podporo za 8 kladov, ki so večinoma geografsko ločeni. V klad, ki pripada vrsti *Asellus aquaticus*, se je uvrstilo največ analiziranih vzorcev z območja Ukrajine, južne in zahodne Rusije ter tudi dva vzorca iz Kazahstana. *A. aquaticus* je torej očitno prisoten tudi v Aziji, vzhodno od Kaspijskega jezera. To je morda posledica razširjanja vzdolž nekdanje Paratetide. Podobno so Esmaeili-Rineh in sod. (2015) ugotovili za rod *Niphargus*, kjer vzhodne vrste ne tvorijo ločenega klada.

V Ukrajini je bila poleg vrste *A. aquaticus* že v predhodnih raziskavah ugotovljena prisotnost genetsko povsem ločene populacije (Verovnik in sod., 2005), ki pripada novi, še neopisani vrsti. Tudi naša raziskava je to potrdila, saj je bilo nekaj vzorcev z območja severovzhodne Ukrajine na filogenetskem drevesu uvrščenih v povsem ločen klad.

Vzorca iz Gruzije sta bila morfološko določena kot *A. monticola* in na filogenetskih drevesih predstavljata ločen klad. Kavkaz naj bi predstavljal severno mejo razširjenosti te vrste, čemur lahko pritrdimo, vendar bi bilo za bolj natančno določitev razširjenosti tega taksona potrebno vzorčiti tudi na severnem obrobju Kavkaza.

Pričakovali smo, da bodo tudi vzorci iz Irana uvrščeni v skupino haplotipov vrste *A. monticola*, saj so iz Irana znani opisi te vrste (Henry in Magniez, 1996), vendar so bili vzorci na obeh drevesih uvrščeni v ločen klad in najverjetneje pripadajo še eni kriptični ločeni vrsti.

V analizo smo za primerjavo vključili tudi nekaj vzorcev iz severnega in vzhodnoazijskega dela Rusije. Vzorca iz severne Rusije sta bila morfološko določena kot *A. latifrons* in na filogenetskih drevesih predstavljata ločen klad. Vzorci iz vzhodnoazijskega dela Rusije so se na naših drevesih razvrstili v tri klade. En pripada vrsti *A. levanidovorum*, druga dva pa sta ozko sorodna, vendar geografsko ločena. Poleg natančnejše morfološke analize bi bile za potrditev ločenih vrst potrebne še dodatne molekulske analize.

Glede na dosedanje raziskave *A. aquaticus*, je vrsta prišla v Evropo pred 8-12 milijoni let iz Azije, preko brakične kotline Paratetide (Verovnik in sod., 2005). Več območij, ki so bila od tam kolonizirana, je služilo kot sekundarni refugij in/ali izvor razširjanja tudi pred začetkom Pleistocena. Post-glacialna obsežna širitev je bila povezana s številnimi ločenimi lokalnimi širitvami iz različnih območij. Stopnja diferenciacije mitohondrijske DNK znotraj vrste se je v teh raziskavah izkazala za višjo, kot so domnevali pred tem. V več primerih je dosegla stopnjo, ki je običajno značilna za različne vrste ali celo rodove (Verovnik in sod., 2005). Zato Sworobowicz in sod. (2015) ugotavljajo, da gre v Evropi zelo verjetno za kompleks visoko divergentnih kriptičnih vrst, ki postavljajo vprašanje, koliko domnevnih vrst v resnici obstaja in kakšen je njihov areal.

Tudi glede na rezultate naše raziskave lahko sklepamo, da je za rod *Asellus* na raziskovanem območju značilna kriptična diverziteteta. Potrebne bi bile še dodatne raziskave, saj ni jasno ali se vse potencialne vrste z ločenimi genetskimi skladi razlikujejo tudi po morfoloških značilnostih.

Populacije so večinoma alopatrične, izjeme so primer iz Ukrajine, kjer sta *A. aquaticus* in neopisana vrsta prisotna na istem območju, ter populacije iz vzhodnoazijskega dela Rusije, kjer se simpatrično pojavljata dva klada, ki med seboj nista tesno sorodna.

Ugotovili smo, da je med populacijami rodu *Asellus* v vzhodni Evropi prisotna speciacija, vendar je zaenkrat še slabo raziskana. Potrebne bi bile nadaljnje molekulske analize v kombinaciji z morfološkimi raziskavami.

6 SKLEPI

- Na podlagi filogenetske analize zaporedij COI in 28S rRNK smo ugotovili, da raziskovani vzorci izopodnih rakov iz rodu *Asellus* pripadajo osmim različnim kladom.
- Območje vzhodne Evrope, Kavkaza in Irana poseljujejo vsaj štiri kladi, ki pripadajo genetsko ločenim vrstam.
- Večji del vzhodne Evrope poseljuje klad, ki pripada vrsti *A. aquaticus*.
- *A. aquaticus* je prisoten tudi v Aziji, vzhodno od Kaspijskega jezera.
- Vzorec iz severne Ukrajine, ki je bil vključen že v predhodne raziskave, pripada ločeni, še neopisani vrsti iz rodu *Asellus*.
- Kavkaz predstavlja severno mejo razširjenosti vrste *A. monticola*.
- Klad iz Irana najverjetneje predstavlja ločeno vrsto.
- Na raziskovanem območju je za rod *Asellus* značilna kriptična diverziteta.

7 POVZETEK

Rod *Asellus* izvira iz vzhodne Azije, v večjem delu Evrope pa na površju živi le vrsta *Asellus aquaticus*. Na območju Kavkaza in Irana je razširjena tudi vrsta *A. monticola*. Natančne meje razširjenosti *A. aquaticus* v vzhodni Evropi niso znane. V diplomskem delu smo se ukvarjali z ugotavljanjem vrstne pripadnosti populacij izopodnih rakov iz rodu *Asellus* v vzhodni Evropi, za primerjavo pa smo vključili tudi vrste, ki poseljujejo vzhodnoazijski del Rusije.

Analizirali smo 54 osebkov rodu *Asellus* iz 25 lokalitet na območju Ukrajine, Rusije, Gruzije, Irana in Kazahstana. Iz osebkov smo izolirali DNK in nato pomnoževali odseke genov za COI ter 28S rRNK v verižni reakciji s polimerazo (PCR). Očiščene produkte PCR smo poslali na sekvenciranje, dobljene sekvence pa uporabili za filogenetske analize. V analizo smo za primerjavo vključili še sekvence 30 drugih vzorcev, ki so bili že predhodno analizirani in so nam služili kot reference in zunanjiki. Iz vseh sekvenc smo z Bayesovo metodo ugotavljali sorodnost med vzorci, ki je na podlagi obeh genov prikazana v obliki dveh filogenetskih dreves.

Filogenetske analize so pokazale, da analizirani vzorci pripadajo osmim kladom, ki so geografsko večinoma ločeni. V klad, ki pripada vrsti *Asellus aquaticus*, se je uvrstilo največ analiziranih vzorcev z območja Ukrajine, južne in zahodne Rusije ter tudi vzorca iz Kazahstana. V Ukrajini se poleg *A. aquaticus* simpatrično pojavlja še genetsko povsem ločena populacija, opažena že v predhodnih raziskavah (Verovnik in sod., 2005), ki smo jo potrdili tudi z našo analizo.

V klad, ki pripada vrsti *A. monticola*, sta se uvrstila le vzorca iz Gruzije. Tako smo potrdili hipotezo, da Kavkaz predstavlja severno mejo razširjenosti te vrste. Vzorci iz Irana so bili uvrščeni v ločen klad, ki verjetno predstavlja ločeno vrsto.

Območje vzhodne Evrope, Kavkaza in Irana torej poseljujejo vsaj štiri kladi, ki pripadajo genetsko ločenim vrstam.

Zaradi kriptične diverzitete bi bile za raziskavo speciacije med populacijami na tem območju potrebne nadaljnje molekulske in morfološke analize.

8 VIRI

- Avise J. C. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge, Harvard University press: 447 str.
- Avise J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of biogeography*, 36, 1: 3-15
- Bickford D., Lohman D. J., Sodhi N. S., Ng P. K., Meier R., Winker K., Ingram K., Das I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*, 22, 3: 148-155
- Birštejn Â. A. 1951. Presnovodnye osliki (Asellota). Fauna SSSR. Moskva, Akademii Nauk SSSR: 144 str.
- Bowman T. E., Holmquist C. H. 1975. *Asellus (Asellus) Alaskensis*, N. Sp., the First Alaskan *Asellus* with Remarks on Its Asian Affinities (Crustacea: Isopoda: Asellidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 88: 59-72
- Cruickshank R. H. 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic and Applied Acarology*, 7, 1: 3-14
- Dover G. A., Tautz D. 1986. Conservation and divergence in multigene families: alternatives to selection and drift. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 312, 1154: 275-289
- Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 5: 1792-97
- Esmaili-Rineh S., Sari A., Delić T., Moškrič A., Fišer C. 2015. Molecular phylogeny of the subterranean genus *Niphargus* (Crustacea: Amphipoda) in the Middle East: a comparison with European Niphargids. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 175, 4: 812-826

- Folmer O. M., Black M., Hoeh R., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5: 304-313
- Google Earth. 2015. v7.1.5.1557. <https://www.google.com/earth/> (7. sep. 2016)
- Google Maps. 2016. <https://maps.google.com/> (9. jul. 2016)
- Gruner H. E. 1965. Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeresteile. Teil 51. Krebstiere oder Crustacea. 5. Isopoda. Jena, Gustav Fischer: 148 str.
- 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
- Henry J. P., Magniez G. 1970. Contribution à la systématique des Asellides (Crustacea Isopoda). *Annales de Speleologie*, 25, 2: 335-367
- Henry J. P., Magniez G. 1983. Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales françaises. 4. Crustacés Isopodes (principalement Asellotes). *Bulletin de la Societe Royale des Sciences de Lyon*, 52: 319-357
- Henry J. P., Magniez G. 1995. Nouvelles données sur les Asellidae épigés d'Extrême-Orient. *Contributions to Zoology*, 65, 2: 101-122
- Henry J. P., Magniez G. 1996. *Asellus (Asellus) monticola* en Iran (Crustacea, Isopoda, Asellota, Asellidae). *Bulletin Zoologisch Museum*, 15, 7: 49-52
- Konec M., Delić T., Trontelj P. 2016. DNA barcoding sheds light on hidden subterranean boundary between Adriatic and Danubian drainage basins. *Ecohydrology*, doi: 10.1002/eco.1727: 9 str.
- Kumar S., Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 10: 2731-2739

- Matsumoto K. 1963. Studies on the subterranean Isopoda of Japan, Part I, No. 1. Tokyo Laboratory of Medical Sciences, Annual Report Supplementum, 13: 1-77
- Petridis D. 1990. Influence of grass carp and tench on the ecology of *Asellus aquaticus*. Archiv für Hydrobiologie, 118, 1: 105-124
- Pliszka F. 1953. Dynamics of feeding relations of the Lake Harsz. Polish Archives of Hydrobiology, 1: 271-300
- Prevorčnik S., Blejec A., Sket B. 2004. Racial differentiation in *Asellus aquaticus* (L.) (Crustacea: Isopoda: Asellidae). Archiv für Hydrobiologie, 160, 2: 193-214
- Rambaut A. 2006. FigTree v1.4. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (5. jun. 2013)
- Rask M., Hiisivuori C. 1985. The predation on *Asellus aquaticus* (L.) by perch, *Perca fluviatilis* (L.), in a small forest lake. Hydrobiologia, 121, 1: 27-33
- Sidorov D. A., Prevorčnik S. 2016. A review of the genus *Asellus* E.L. Geoffroy, 1762 (Crustacea: Isopoda: Asellidae) from the Asian part of Russia, with description of plesiomorphic *A. turanaicus* sp.n. Arthropoda Selecta, 25, 2: 157-169
- Sket B. 1994. Distribution of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae) and its hypogean populations at different geographic scales, with a note on *Proasellus istrianus*. Hydrobiologia, 287: 39-47
- Stammer H. J. 1932. Zur Kenntnis der Verbreitung und Systematik der Gattung *Asellus*, insbesondere der mitteleuropäischen Arten (Isopoda). Zoologischer Anzeiger, 99: 113-131
- Stoch F. 1984. Su *Asellus aquaticus cavernicolus* Rac., 1925 (Crustacea, Isopoda) nella Grotta di Trebiciano, 17VG (Carso Triestino). Atti e memorie della Commissione Grotte Eugenio Boegan, 23: 69-73
- Sworobowicz L., Grabowski M., Mamos T., Burzyński A., Kilikowska A., Sell J., Wysocka A. 2015. Revisiting the phylogeography of *Asellus aquaticus* in Europe: insights into cryptic diversity and spatiotemporal diversification. Freshwater Biology, 60, 9: 1824-1840

- Trontelj P., Fišer C. 2009. Cryptic species diversity should not be trivialised. *Systematics and Biodiversity*, 7, 1: 1-3
- Turk S., Sket B., Sarbu Ş. 1996. Comparison between some epigeal and hypogean populations of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae). *Hydrobiologia*, 337: 161-170
- Verovnik R. 1998. Genetska diferenciacija jamskih in površinskih populacij vodnega oslička *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) v povodju kraške Ljubljanice. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 51 str.
- Verovnik R. 2003. Filogeografija vodnega oslička na Dinarskem krasu Slovenije. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 82 str.
- Verovnik R., Sket B., Prevorčnik S., Trontelj, P. 2003. Random amplified polymorphic DNA diversity among surface and subterranean populations of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Genetica*, 119, 2: 155-165
- Verovnik R., Sket B., Trontelj P. 2004. Phylogeography of subterranean and surface populations of water lice *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Molecular Ecology*, 13, 6: 1519-1532
- Verovnik R., Sket B., Trontelj P. 2005. The colonization of Europe by the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) proceeded from ancient refugia and was directed by habitat connectivity. *Molecular Ecology*, 14: 4355-4369
- Verovnik R., Prevorčnik S., Jugovic J. 2009. Description of a neotype for *Asellus aquaticus* Linne, 1758 (Crustacea: Isopoda: Asellidae), with description of a new subterranean *Asellus* species from Europe. *Zoologischer Anzeiger*, 248: 101-118
- Whitehurst I. T. 1991. The Gammarus: *Asellus* ratio as an index of organic pollution. *Water Research*, 25, 3: 333-339

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju, izr. prof. dr. Rudiju Verovniku, za vodstvo skozi diplomu in veliko mero potrpežljivosti.

Najlepša hvala recenzentki, doc. dr. Simoni Prevorčnik, za mnogo koristnih nasvetov in hiter pregled naloge ter doc. dr. Cenetu Fišerju za kritične pripombe.

Za pomoč pri delu v laboratoriju se zahvaljujem Marjeti Konec, Teu Deliću, Valeriji Zakšek, Ajdi Moškrič in Žigu Fišerju.

Hvala vsej družini, še posebej pa atiju, ki me je vedno spodbujal, naj dokončam začeto. Zelo mi je žal, da ne moreva skupaj nazdraviti.

Dragi Gregor, hvala, ker si ob meni.