

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Jernej BRAVNIČAR

**TAKSONOMSKA ANALIZA KAPLJA (*Cottus sp.*) V SLOVENIJI
Z UPORABO MOLEKULARNIH METOD**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**TAXONOMIC ANALYSIS OF BULLHEAD (*Cottus sp.*) IN SLOVENIA
WITH APPLICATION OF MOLECULAR METHODS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, Oddelku za zootehniko, Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo. Terensko delo se je odvijalo na območju Slovenije, Italije, Hrvaške, Bosne in Hercegovine in Srbije.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala višjega znanstvenega sodelavca dr. Aleša Snoja.

Komisija za oceno dela in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Cene FIŠER
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Član: viš. znan. sod. dr. Aleš SNOJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 13.9.2012

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Jernej Bravničar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dn

DK UDK 59:592(043.2)=163.6

KG kapelj / *Cottus* / Balkan / filogeografija / mtDNA

AV BRAVNIČAR, Jernej

SA SNOJ, Aleš (mentor)

KZ SI-1001 Ljubljana, Večna pot 111

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2012

IN TAKSONOMSKA ANALIZA KAPLJA (*Cottus sp.*) V SLOVENIJI Z UPORABO MOLEKULARNIH METOD

TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)

OP VI, 51 str., 4 pregl., 11 sl., 61 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Slovenijo naj bi na osnovi morfoloških podatkov naseljevali dve vrsti evropskega kaplja, *Cottus gobio* in *C. metae*. Za slednjega so znane tri lokalitete, predvideva pa se, da poseljuje areal od izvirmih delov Save do pritoka Kolpe. Tako Kolpo kot reke jadranskega povodja in dravskega porečja pa naj bi poseljeval *C. gobio*. V raziskavi smo želeli ugotoviti, ali se kaplji, ki naseljujejo areal vrste *C. metae*, na osnovi nukleotidnega zaporedja kontrolne regije mitohondrijske DNA (CR mtDNA) ločijo od vrste *C. gobio*. Poleg tega smo želeli ugotoviti, koliko filogeografskih linij kaplja naseljuje Slovenijo. Vzorčili smo tudi na širšem območju severozahodnega Balkana, ki na splošno velja za vročo točko biodiverzitete. Izkazalo se je, da kaplji *C. metae* na podlagi CR mtDNA tvorijo lastno filogeografsko linijo. Kaplji *C. gobio*, ki naseljujejo vodotoke jadranskega povodja in dravskega porečja, skupaj z ostalimi evropskimi pripadniki vrste tvorijo lasten klad. Z veliko verjetnostjo lahko trdimo, da kaplji, ki poseljujejo Kolpo, na molekularni osnovi ne spadajo v vrsto *C. gobio*. Ti namreč skupaj s haplotipi, ki jih najdemo v reki Uni, tvorijo lastno linijo. Filogenetske raziskave so pokazale, da se evropski kapelj v osnovi deli na dve sestrski skupini, ki po naši razlagi predstavljata dva časovno ločena kolonizacijska vala. Domnevamo, da je kaplju zahodni Balkan služil kot odskočna deska kolonizacije Evrope obeh valov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 59:592(042.2)=163.6

CX bullhead / Cottus / Balkans / phylogeography / mtDNA

AU BRAVNIČAR, Jernej

AA SNOJ, Aleš (supervisor)

PP SI-1001 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2012

TI TAXONOMIC ANALYSIS OF BULLHEAD (*Cottus sp.*) IN SLOVENIA WITH
APPLICATION OF MOLECULAR METHODS

DT Graduation Thesis (University studies)

NO VI, 51 p., 4 tab., 11 fig., 61 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Two morphologically defined European bullhead species, *Cottus gobio* and *C. metae*, are known to inhabit the rivers in Slovenia. There are three described localities of *C. metae* with presumed species range from the headwaters of the Sava river to the Kolpa confluence. *C. gobio* assumed range are the Kolpa and Drava watershed along with the rivers of the Adriatic drainage. The aim of this study was to assess whether the bullheads populating the *C. metae* range are genetically distinct from the neighboring *C. gobio*. We also tended to perform phylogeographic analysis to find out how many lineages of bullhead are there in Slovenia. Besides Slovenia, sampling was performed also in a wider area of northwestern Balkans, which is known as one of the main European biodiversity hot spots. Based upon CR mtDNA analysis, *C. metae* turned to be a distinctive phylogeographical lineage, while the sample-set of the Drava and Adriatic drainage was recognized as *C. gobio*. Bullheads in the Kolpa river poses haplotypes, which are mostly related to the ones found in the Una, and together form a distinctive phylogeographic lineage that was found to be related neither to *C. gobio* nor *C. metae*, and possibly represent a new species. Phylogenetic studies showed that European bullheads form two major groups, each of which were involved in two subsequent colonization waves of Europe. We suggest that both colonizations started in the western Balkans.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VI
Kazalo slik	VI
1. UVOD	1
1.1. OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2. RAZNOLIKOST RODU <i>Cottus</i> V EVROPI	4
1.3. KOLONIZACIJSKA ZGODOVINA KAPLJA V EVROPI	8
2. MATERIALI IN METODE	12
2.1. VZORCI	12
2.2. METODE	18
2.2.1. <i>PRIPRAVA VZORCEV IN IZOLACIJA DNK</i>	18
2.2.2. <i>POMNOŽEVANJE V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO (PCR)</i>	19
2.2.3. <i>DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA</i>	20
2.2.4. <i>NASIČENOST SEKVENC</i>	21
2.2.5. <i>FILOGENETSKE IN FILOGEOGRAFSKE ANALIZE</i>	21
3. REZULTATI	25
3.1. ZNAČILNOSTI ZAPOREDIJ	25
3.2. FILOGENETSKA DREVESA	28
3.3. MREŽNA ANALIZA HAPLOTIPOV	33
4. RAZPRAVA	36
4.1 KAPLJI V SLOVENIJI IN BLIŽNJI OKOLICI	36
4.2 POMEN BALKANSKEGA POLOTOKA PRI KOLONIZACIJI EVROPE	38
5. SKLEPI	43
6. POVZETEK	44
7. LITERATURA	46

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Delitev evropskega kaplja na vrste po Kottelat in Freyhof 2007	5
Preglednica 2: Seznam lokalitet s spremljajočimi podatki	13
Preglednica 3: Seznam haplotipov, ki smo jih uporabili v analizah	15
Preglednica 4: Seznam izoliranih vzorcev	26

KAZALO SLIK

Slika 1:	Navadni kapelj (<i>Cottus gobio</i>) iz Donave	1
Slika 2:	Ostanki okostenelih luskbodci, pod prsno plavutjo	2
Slika 3:	Zemljevid evropskih rek z areali kladov in vrst	6
Slika 4:	Zemljevid lokalitet v Sloveniji	14
Slika 5 :	Zemljevid lokalitet iz katerih haplotipe smo uporabili v analizah	17
Slika 6:	Graf nasičenosti sekvenc s substitucijami	27
Slika 7:	Filogenetsko drevo po metodi ML v programu PhyML	28
Slika 8:	Filogenetsko drevo izdelano po Bayesovi metodi v programu BEAST	31
Slika 9:	Filogram izdelan po Bayesovi metodi v programu BEAST	32
Slika 10:	Mreža haplotipov Balkana izrisana s programom Network	33
Slika 11:	Mreža evropskih haplotipov izrisana s programom Network	35

1. UVOD

1.1. OPREDELITEV PROBLEMA

Slovenijo poseljujeta dve vrsti kaplja, *Cottus gobio* Linnaeus, 1758 in nedavno opisana *C. metae* Freyhof, Kottelat & Nolte, 2005 (Freyhof in sod. 2005, Kottelat in Freyhof 2007).



Slika 1: Navadni kapelj (*Cottus gobio*) iz Donave

C. metae (barjanski kapelj) naj bi naseljeval zgornje porečje Save, in sicer od njenih izvirov do sotočja s Kolpo. Za to vrsto so značilni okosteneli ostanki lusk pod prsno plavutjo (angl. prickles), kar v slovenščino prevajamo kot bodci. Bodci lahko pri osebkih, velikih okoli 8 cm ali več, izginejo (Freyhof in sod. 2005). Holotipski primerek izvira iz reke Iščice ob Igu pri Ljubljani, tej lokaciji pa pripada še deset opisanih paratipskih primerkov. Dodatnih primerkov, ki so prispevali k opisu karakteristik vrste, je še 12 iz neimenovanega potoka v Ljubljani in šest iz Save Bohinjke pri Bohinjski Bistrici (Freyhof in sod. 2005). Na podlagi teh lokacij je bil predlagan tudi zgoraj omenjeni areal vrste.

Vrsto *C. gobio* (navadni kapelj) v Sloveniji najdemo v rekah jadranskega povodja ter v porečjih Drave in Kolpe. Navadni kapelj je precej razširjena vrsta, ki na severu naseljuje vodotoke Švedske, potoke ob obalah Finske in Rusije ob Baltiku, Labo, Ems, Weser, zgornji Ren, porečje Rone, porečje Donave (z izjemo pritokov Save in Argesa) in reke, ki se stekajo v Jadransko morje – od italijanske Potenze na zahodu do hrvaške Zrmanje na vzhodu z izjemo Timave pri Trstu, ki jo poseljuje *C. scaturigo*. Glede na ugotovitve Freyhofa in sod. (2005) navadni kapelj nima bodcev in se od barjanskega loči tudi po krajši relativni predorzalni razdalji (30–35 % standardne dolžine telesa (SL) proti 35–40 % SL) ter krajši relativni razdalji med konico gobčka in bazo prve dorzalne plavuti (49–55 % SL proti 53–59 % SL) (Kottelat in Freyhof 2007), čeprav je iz navedenih podatkov razvidno, da se vrednosti prekrivajo. Vendar pa isti avtorji ugotavljajo, da se navadni kapelj iz Kolpe od barjanskega morfološko loči le po odsotnosti bodcev, medtem ko ju na podlagi morfometričnih znakov ni moč razlikovati (Freyhof in sod. 2005).



Slika 2: Ostanke okostenelih lusk–bodci (angl. prickles) pod prsno plavutjo (domnevno značilne za *C. metae*). Vir: Handbook of European freshwater fishes, Kottelat in Freyhof 2007)

V nasprotju s Persat in sod. (1996), ki bodce obravnavajo kot vrstno specifičen znak, nekateri drugi raziskovalci ugotavljajo, da so bodci za tako zelo variabilen rod, kot je *Cottus*, relativno nezanesljiv taksonomski znak (Krejsa 1967, Koli in sod. 1969, Eppe in sod. 1999). Na lokacijah znotraj predlaganega areala vrste *C. metae* so bile najdene populacije, ki morfometrično ustrezajo opisu vrste, vendar pa bodci niso bili prisotni niti pri manjših osebkih (Zavod za ribištvo Slovenije, osebni kontakt). Kaže torej, da določanje vrste ni zanesljivo ne na podlagi bodcev kakor tudi ne na podlagi opisanih morfometričnih znakov.

Filogeografija je področje znanosti, ki se ukvarja s historičnimi povezavami in vzroki prostorske razporeditve genealoških linij (v tem kontekstu filogeografskih linij), še posebej tistih znotraj sorodnih vrst (Avice 2000). Na navadnem kaplju je bilo narejenih že kar nekaj filogeografskih analiz, predvsem na kontrolni regiji mitohondrijske DNA (CR mtDNA; Englbrecht in sod. 2000, Kontula in Vainola 2001, Hänfling in sod. 2002, Volckaert in sod. 2002, Knapen in sod. 2003). Medtem ko so filogeografske informacije o barjanskem kaplju zelo omejene in ne zadosti informativne (Šlechtova in sod. 2004).

Namen diplomske naloge je bil v prvi vrsti ugotoviti, ali se kaplji, ki naseljujejo areal vrste *C. metae*, na osnovi nukleotidnega zaporedja CR mtDNA razlikujejo od vrste *C. gobio*. Poleg tega smo želeli ugotoviti, koliko filogeografskih linij kaplja je v Sloveniji, kakšna je njihova zemljepisna porazdeljenost in kako sorodne so z že poznanimi linijami. Na tej osnovi smo želeli ugotoviti evolucijsko zgodovino kaplja v Sloveniji.

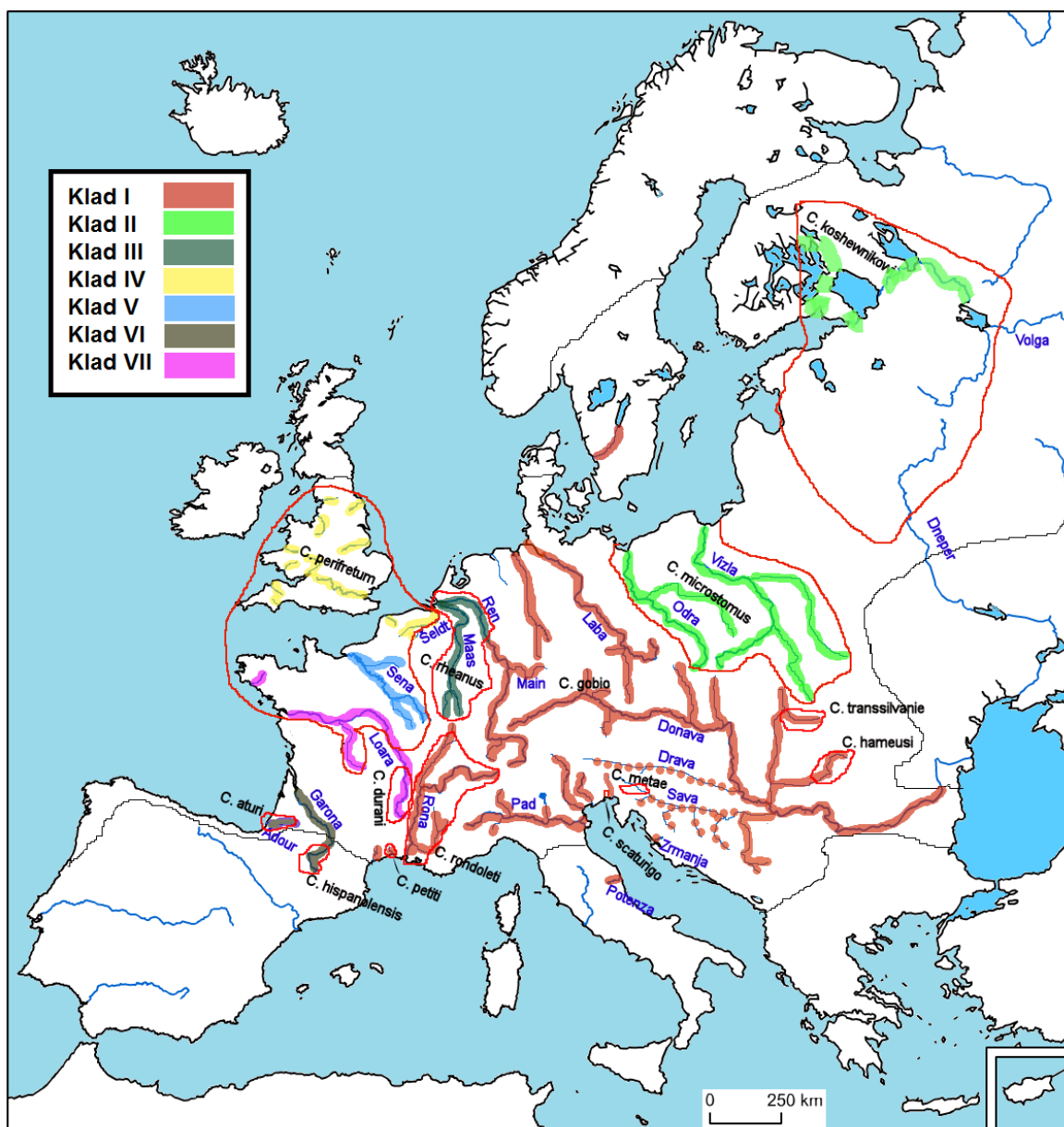
1.2. RAZNOLIKOST RODU *Cottus* V EVROPI

Kaplji v Evropi so ena izmed genetsko najbolj variabilnih sladkovodnih ribjih skupin (Koli 1969, Hänfling in Brandl 1998). Skupina je idealna za proučevanje kolonizacijskih poti in historičnih povezav med povodji, saj zaradi ekonomske neatraktivnosti ni bila podvržena človeškim manipulacijam (vnosi in prenosi), poleg tega gre za relativno staro linijo z velikim arealom (Englbrecht in sod. 2000).

Kottelat in Freyhof (2007) ločujeta 16 vrst kapljev z arealom v Evropi (Preglednica 1). Pred revizijo rodu (Freyhof in sod. 2005) so bile priznane le 3 vrste: *C. gobio*, *C. ferrugineus* in *C. poecilopus*. Slednja je nesporna evolucijska enota, ki je svoj areal na severu Evrope kolonizirala ločeno od ostalih kapljev, medtem ko se je *C. gobio* izkazal za kompleks več vrst, med njimi tudi *C. metae*. *Cottus ferrugineus* pa je po reviziji obravnavan kot *C. gobio* (Freyhof in sod. 2005). Morfološko prepoznavanje vrst kapljev je težavno zaradi nizke medvrstne variabilnosti in velike variabilnosti znotraj vrst. Vrste večinoma niso simpatrične, na nekaterih območjih pa med njimi prihaja tudi do sekundarnega stika in je posledično opaziti hibridne pasove (Kontula in Vainola 2001, Nolte in Sheets 2001, Kontula in sod. 2003). Ko govorimo o evropskem kaplju, imamo torej v mislih kompleks *C. gobio*. Raziskave CR mtDNA evropskega kaplja so omogočile podrobnejši vpogled v filogeografsko strukturo kaplja širom Evrope in v filogenetske odnose med posameznimi kladi (Englbrecht in sod. 2000, Kontula in Vainola 2001, Hänfling in sod. 2002, Volckaert in sod. 2002, Knapen in sod. 2003, Šlechtova in sod. 2004).

Preglednica 1: Delitev evropskega kaplja na vrste po Kottelat in Freyhof 2007

Vrsta	Območje razširjenosti	Prisotnost bodcev	Linije po Engelbrechtu in Hanflingu
<i>C. gobio</i>	Povodja severnega Baltika, Švedska, Finska, Rusija do jugozahoda Estonije, Donava, Laba (Cz,Ne), Ems (Ne, Ni), Weser (Ne), Rona (Fr), Pritoki zgornjega Rena (Ne, Sv), centralna Italija, reke Jadranskega povodja, Neretva (Hr)	Načeloma odsotni	Klad I
<i>C. rondeleti</i>	Herault (Fr)	Ne	
<i>C. scaturigo</i>	Timavo (It)	Ne	
<i>C. haemusi</i>	Pritok Donave Beli Vit v Bulgariji, možno tudi v pritokih spodnje Donave	Ne	
<i>C. transsilvaniae</i>	Romunija, zgornji tokovi Argesa, lahko prisotni tudi v drugih pritokih spodnje Donave.	Ne	
<i>C. petiti</i>	Lez (Fr)	Da	Klad II
<i>C. kosshewnikowi</i>	Zgornji tokovi Volge, severni in vzhodni del zaliva Bothnie	Da	
<i>C. microstomus</i>	Povodje Črnega morja, Dnester (Ukr, Mol), Južni pritoki Baltika na Poljskem, najverjetneje prisoten vzhodneje do Litve.	Da	Klad II
<i>C. metae</i>	Pritoki zgornje Save (Slo)	Da	Klad III
<i>C. rheanus</i>	Meusa (Ne), pritoki Rena (Ne), vključno s pritoki Main in Neckar.	Ne	
<i>C. perifretum</i>	Velika Britanija, reke, ki se zlivajo v Atlantik, od Garonne do Šeldta (Fr, Be). Invazivna v povodju Rena (Ne,Ni)	Da	Klad IV
<i>C. aturi</i>	Reki Adour (Fr) in Nivelle (Fr in Sp)	Da	Klad VI
<i>C. duranii</i>	Zgornji tokovi Dordogne (Fr) in Loire (Fr)	Da	Klad VII
<i>C. hispaniolensis</i>	Južno povodje Garonne (Fr, Sp)	Ne	Klad VIII



Slika 3: Zemljevid evropskih rek z areali kladov (Englbrecht in sod. 2000, Volckaert in sod. 2002) in vrst (z rdečo obrobo so označeni areali vrst; Kottelat in Freyhof 2007)

Lastnosti mtDNA, kot so dedovanje po materini strani, enostavna izolacija, odsotnost rekombinacij, hitrejša fiksiranje novih variant, visoka stopnja mutacij in posledično visoka intraspecifična heterogenost, so glavni razlogi za prevlado mtDNA v filogeografskih raziskavah. V zadnjem času pa se omenjene analize širijo tudi na jedrno DNA, pri čemer ugotavljajo, da v določenih primerih prihaja do neskladja rezultatov med jedrnimi in mitohondrijskimi markerji (Toews in Brelford 2012). Pri evropskem kaplju, kjer so preučevali tudi jedrni gen za veliko podenoto rRNA (LSU) (Sonnenberg in sod. 2007), tega neskladja niso opazili.

V Evropi so bile populacije kaplja na podlagi CR mtDNA razdeljene na 8 kladov (Engelbrecht in sod. 2000, Volckaert in sod. 2002). Nekateri kladi sovpadajo s kasneje opisanimi vrstami, vendar pa na vseh vrstah še ni bilo izvedenih molekularnih analiz (glej sliko 3). Najobsežnejši in najbolj heterogen je klad I, katerega populacije poseljujejo predvsem centralno Evropo (Donava, Laba, Majna, zgornji tok Rena, Rona, Pad, zahodne obale Baltika ter švedska jezera). Iz prednikov klada I naj bi se razvil tudi klad II, ki ga sestavljajo populacije z arealom rek vzhodne Evrope, kot sta Odra in Visla, populacije poljskih rek in jugovzodnega dela Finske ter reke, ki se stekajo v Baltik. Ločitev na vzhodno (klad I) in zahodno linijo (klad II) na področju Baltika je bila predlagana že na osnovi morfologije (Koli 1969). Klad III tvorijo populacije zahodnoevropske reke Maas, nekaj haplotipov tega klada pa je bilo najdenih tudi v spodnjem Renu, kjer gre najverjetneje za antropogen vnos.

Kaplji Velike Britanije spadajo skupaj s populacijami reke Šeldt, z izlivom v Severno morje, v klad IV. Te naj bi bile glede na filogenetske analize najbolj sorodne populacijam kladov V (Sena) in VI (Adour in Garona; Englbrecht in sod. 2000). Osebki, ki naseljujejo reke Bretanije in Loaro v Franciji, tvorijo klad VII. Na območju Balkana pa so bile opravljene analize v zelo omejenem obsegu (Volckaert in sod. 2002, Šlechtova in sod. 2004).

Balkan sicer pri veliko skupinah velja za vročo točko biodiverzitete ter območje velikega števila endemnih vrst (Griffiths in sod. 2004). Visoka stopnja biodiverzitete je predvsem posledica velike klimatske in topografske raznolikosti, razvodja treh rečnih sistemov (donavski, jadranski, egejski) ter vloge glacialnega zatočišča (Griffiths in sod. 2004). Edina filogeografska raziskava opravljena na tem območju sicer ne omenja visoke stopnje raznolikosti (Šlechtova in sod. 2004), je pa le ta razvidna iz rezultatov. Tako naj populacije Kolpe in Tare ne bi pripadale nobenemu znanemu kladu, a je njihova umestitev zaradi slabe statistične podpore nerazrešena. Predvideva se, da kljub vsemu pripadajo vrsti *C. gobio* (Freyhof in sod. 2005). Šlechtova je v zelo omejenem obsegu (vzorci iz Iške in Iščice) analizirala tudi kaplje, ki pripadajo populaciji *C. metae*. Glede na njene zaključke naj bi haplotipi Iščice pripadali kladu I, medtem ko naj bi haplotipi iz Iške tvorili lasten klad.

1.3. KOLONIZACIJSKA ZGODOVINA KAPLJA V EVROPI

Za razliko od kopenskih živali so ribe pri disperziji omejene na dvodimenzionalni prostor rečnih mrež, katerih povezave so se skozi geološko zgodovino zemlje spreminjale. Tako kot večina sladkovodnih vrst rib (Banarescu 1990, 1991) naj bi bil tudi kapelj v Evropi prisoten že v poznem miocenu (Heizmann 1992). Paleontološko vrsta sicer ni dovolj raziskana, vendar pa fosilni ostanki pričajo o nesporni prisotnosti kaplja v Evropi v pliocenu (Costedoat in Gilles 2009). Kapelj naj bi tako kot veliko drugih centralnoevropskih ribjih vrst Evropo koloniziral preko starodavne Donave iz Paratetisa (današnje Kaspijsko, Črno morje in Aralsko morje; Banarescu 1990, 1991). Predniška populacija danes živečih kapljev kompleksa *C. gobio* naj bi bila v Evropi prisotna že nekje pred 10 milijoni let (Englbrecht in sod. 2000).

Kolonizacija Evrope naj bi se pričela v poznem pliocenu preko osi Donava – Laba – Baltik. V tem času naj bi kapelj naselil centralno in severno Evropo. Predvidevajo, da so kasneje, na meji med pliocenom in pleistocenom, populacije centralne Evrope dosegle severovzhodni del Severnega morja in prek obal kolonizirale atlantsko regijo vse do severne Španije. Populacije povodij na Poljskem (klad II) naj bi se razvile direktno iz populacij spodnje Donave (klad I) oziroma so kolonizirale te reke direktno iz Črnega morja prek Dnepra. To naj bi se zgodilo v pleistocenu pred 1,2 milijonom let (Englbrecht in sod. 2000). Predniški kaplji iz reke Maas (klad III) naj bi kolonizirali tudi reko Šeldt (klad IV), reke Velike Britanije (klad IV), Seno (klad V), Loaro (klad VII), Adour in Garono (klad VI). Klad I kot najbolj heterogen in razširjen klad naj bi služil kot bazen za celotno kolonizacijo Evrope. Najbolj recentna kolonizacija klada I (po zadnji ledeni dobi) je

poselitev Švedske prek Nemčije (Kontula in Väinöla 2001). Med würmsko poledenitvijo so kaplji zgornjega Rena kolonizirali Ženevsko jezero (Vonlanthen in sod. 2007). To naj bi se zgodilo zaradi glacialnega zajema potokov, ko se je ronski ledenik umikal prek povodja Rena. Na podoben način naj bi bila preko Alp kolonizirana tudi severna Italija prek porečji Donave, Rone in Rena (Šlechtova in sod. 2004). Kolonizacija jadranskega povodja naj ne bi bila enkraten pojav (Šlechtova in sod. 2004). Če se Alpe niso izkazale kot ovira za kolonizacijo, pa naj bi Dinaridi zaradi odsotnosti ledenih kap kapljem onemogočali kolonizacijo rek jadranskega povodja iz rek donavskega porečja (Šlechtova in sod. 2004). To naj bi bil razlog za odsotnost kaplja v hrvaških rekah jadranskega povodja z izjemo Zrmanje, ki naj bi bila kolonizirana prek Prapada.

Vsi zgoraj omenjeni časovni okvirji temeljijo na uporabi molekularne ure hitrosti 1 % divergence med sekvencama na milijon let (Englbrecht in sod. 2000). Ocena te molekularne ure izhaja iz predpostavke, da se je Rona od zgornjega Rena odcepila pred milijonom let (Hantke 1993), distanca med haplotipi teh dveh rek pa je ravno 1 %. Ta hitrost molekularne ure se uporablja tudi pri lipanu (*Thymallus thymallus*), ki ima podobne kolonizacijske poti in odnose med filogeografskimi linijami kot kapelj (Gum in sod. 2009). Volckaert in sodelavci (2002) so postavili teorijo, da so se kladi kaplja formirali v pleistocenu, vendar pa so temu ustrezno prilagodili molekularno uro na 9 % divergence. Predpostavili so, da so štiri glavne divergence znotraj dobljenih dreves proporcionalne časom štirih glavnih pleistocenskih poledenitev, med katerimi naj bi kapelj širil svoj areal. Tako naj bi v zgodnjem pleistocenu *C. gobio* poseljeval spodnjo Donavo, ko so bile temperature v zahodni palearktiki mile (Lowe in Walker 1997). Otoplitev na začetku prvega glaciala gūnz, pred 430 tisoč leti, pa naj bi omogočila prvo severnozahodno

kolonizacijo prek Dnepra, Visle in povodij severnoevropske nižine. Večina populacij te prve kolonizacije naj bi izginila zaradi kasnejših glaciacij (Bernatchez in Wilston 1998) z izjemo klada III (Maas), ki je preživel na zahodnem robu severnoevropske nižine. Od tam je služil kot kolonizacijski bazen za klad IV. Klad I naj bi nato ponovno koloniziral prej uničene habitate. Klad II naj bi nastal iz klada I ter se razširil med würmsko glacialo pred približno 70 tisoč leti, tik pred začetkom velike ohladitve (Lowe in Walker 1997).

2. MATERIAL IN METODE

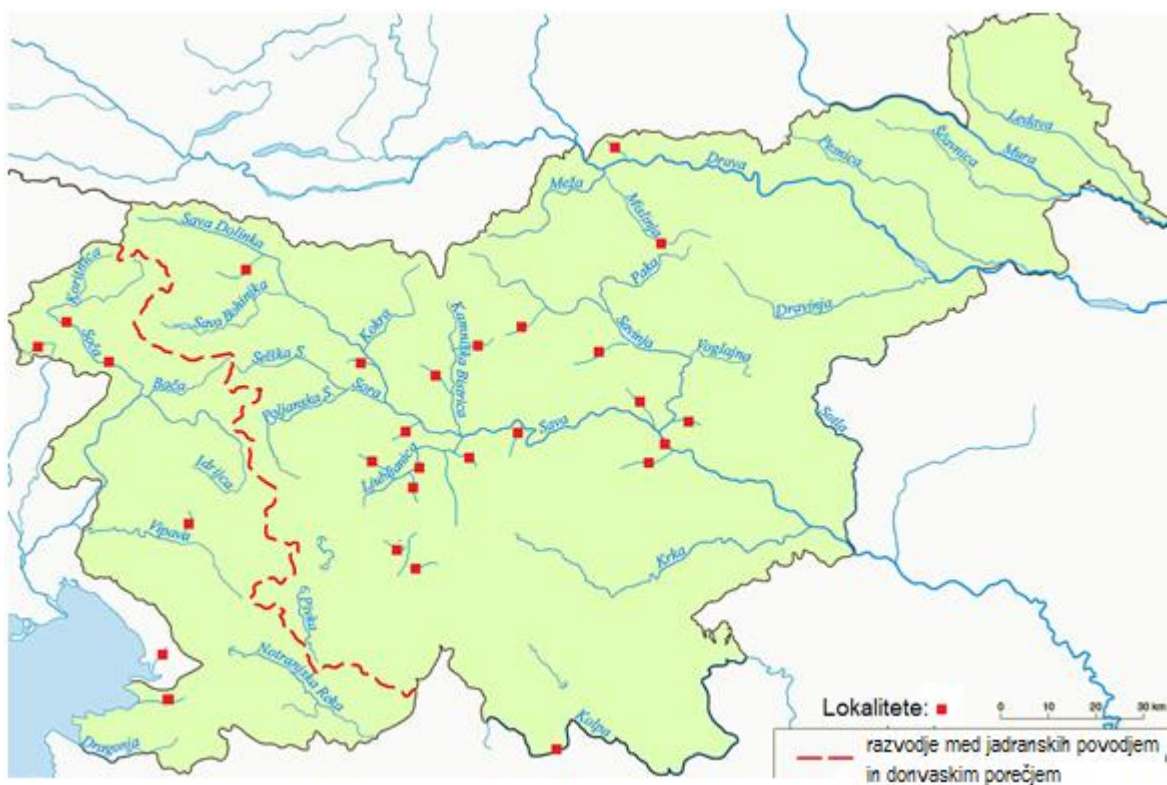
2.1. VZORCI

V raziskavo smo vključili 147 kapljev različnih velikosti, ki smo jih med letoma 2009 in 2011 s pomočjo elektroagregata vzorčili na 35 lokacijah v Sloveniji, Italiji, Bosni in Hercegovini in na Hrvaškem (preglednica 2, sliki 4 in 5). Kjer je bilo mogoče, smo vzorčili vsaj pet rib na lokaliteto. Vsakemu vzorčenemu osebku smo odstrigli košček prsne plavuti, kaplja vrnil v vodo, vzorec plavuti pa shranili v 96 % etanolu. Do izolacije DNA so bili vzorci shranjeni na sobni temperaturi.

V analizo smo kot referenčni material vključili tudi nukleotidna zaporedja CR mtDNA različnih populacij navadnega kaplja v Evropi, ki so bila objavljena v dveh predhodnih filogeografskih raziskavah (Volckaert in sod. 2002, Šlechtova in sod. 2004). Le-ta so dostopna v bazi podatkov »GenBank« (AF381189-AF381217 in AY453695-AY453766, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Na podlagi dognanj filogenetskih raziskav rodu *Cottus* (Kontula in sod. 2003, Yokoyama in Goto 2005, Kinziger in sod. 2005) smo kot zunanjo skupino (angl. outgroup), s katero smo koreninili filogenetska drevesa, uporabili vrsti *C. reinni* in *C. pollux* (Japonska).

Preglednica 2: Seznam lokalitet s spremljajočimi podatki (Pov. = povodje/ D=donavsko, J=jadransko, Drž.=država/ SI=Slovenija, HR=Hrvaška, BIH=Bosna in Hercegovina, IT=Italija, N= število uspešno izoliranih vzorcev)

Ime vodotoka	Porečje	Pov	Večji Kraj	Drž.	Oznaka	Oznaka Haplotipa	N	Datum	Koordinate
Mrzlek	Cerkniščica/Sava	D	Župeno	SI	MRZ	LOV2	5	16.5.09	46°50'13,95" N, 14°25'27,02" E
Bistrica	Drava	D	Muta	SI	MUT	-	1	14.10.10	46°36'44,35" N, 15°09'57,93" E
Mislinja	Drava	D	Turišla vas	SI	MIS	MIS1	2	11.10.10	46°28'12,07" N, 15°08'09,80" E
Nevljica	Kamniška Bistrica	D	Šmar.Tuhinju	SI	NEV	NEV1	5	9.7.10	46°12'46,08" N, 14°44'14,96" E
Pšata	Kamniška Bistrica	D	Zal.p.Cerkljah	SI	PSA	-	5	9.7.10	46°13'39,68" N, 14°31'25,97" E
Borovniščica	Ljubljana/Sava	D	Prušnica	SI	BOR	BOR1	2	10.10.10	45°54'57,70" N, 14°23'90,80" E
Horjulščica	Ljubljana/Sava	D	Horjul	SI	HOR	POD2	5	7.7.09	46°02'24,11" N, 14°23'04,27" E
Hribski potok	Ljubljana/Sava	D	Vrhnika	SI	HRI	HRI1	5	10.10.10	45°57'35,20" N, 14°17'32,08" E
Iščica	Ljubljana/Sava	D	Ig	SI	ISC	POD2/ISC6	5	7.4.09	45°57'56,32" N, 14°32'30,80" E
Podlipščica	Ljubljana/Sava	D	Vrhnika	SI	POD	POD2	4	28.3.09	45°59'35,36" N, 14°14'55,56" E
Cerkniščica	Cerkniščica/Sava	D	Sv.Vid	SI	CER	LOV2	2	13.5.11	45°49'57,16" N, 14°27'45,33" E
Gameljščica	Sava	D	Povodje	SI	GAM	BOR1	5	8.6.09	46°08'51,68" N, 14°29'00,20" E
Gračnica	Sava	D	Jurklošter	SI	GRA	GRA5	5	12.7.10	46°05'56,24" N, 15°19'42,47" E
Kandraščica	Sava	D	Milince	SI	KA1	-	1	8.8.10	46°08'44,88" N, 14°53'37,68" E
Litiščica (Reka)	Sava	D	Litija	SI	LIT	BOR1	5	9.10.10	46°01'15,98" N, 14°45'24,35" E
Lovranovo	Sava	D	Lovranovo	SI	LOV	LOV2	2	13.5.11	45°48'58,13" N, 14°28'10,68" E
Mangoliški potok	Sopota/Sava	D	Radeče	SI	MAN	MAN1	2	27.10.10	46°02'54,49" N, 15°04'48,30" E
Medija	Sava	D	Čebelica	SI	MED	BOR1	5	7.10.10	46°08'45,93" N, 14°54'50,88" E
Nemiljščica	Sava	D	Zg. Besnica	SI	NEM	NEM1	5	28.5.09	46°16'14,28" N, 14°15'02,67" E
Radovna	Sava Dolinka/Sava	D	Radovna	SI	RAD	RAD2/RAD6	5	24.3.09	46°24'00,62" N, 14°00'01,48" E
Sopota	Sopota/Sava	D	Radeče	SI	SOP	BOR1	5	27.10.10	46°04'03,29" N, 15°05'28,84" E
Motinjščica	Savinja/Sava	D	Boljka	SI	MOT	-	5	9.7.10	46°13'23,88" N, 14°55'17,04" E
Petrinjščica	Kolpa/Sava	D	Mipčinovič	HR	PET	PET1	5	9.7.06	-
Lepenica	Bosna/Sava	D	Brnjači	BiH	LEB	KAS1	5	17.6.09	-
Sutjeska	Drina/Sava	D	Tjentište	BIH	SUT	SUT1	5	19.6.09	-
Kasindolska	Bosna/Sava	D	Kasindo	BiH	KAS	KAS1	5	17.6.09	-
Vrbas	Vrbas/Sava	D	Jajce	BIH	JAJ	JAJ1,JAJ3	4	10.7.06	-
Una	Una/Sava	D	Bihać	BIH	UNA	UNA1/UNA3	3	26.8.08	-
Hubelj	Vipava/Soča	J	Vipava	SI	1HUB	HUB1/HUB2/SOC2	5	7.4.09	45°52'29,70" N, 13°54'22,43" E
Soča	Soča	J	Tolmin	SI	1SOČ	SOC3/SOC5	5	13.10.09	46°11'26,14" N, 13°42'37,47" E
Nadiža	Bela	J	Podbela	SI	NAD	-	4	13.10.09	46°14'32,91" N, 13°27'19,55" E
Rizana	Rizana	J	Koper	SI	RIŽ	RIZ4	5	12.8.10	45°32'33,76" N, 13°48'33,35" E
Tolminščica	Soča	J	Korita	SI	TOL	TOL	5	23.10.09	46°12'13,96" N, 13°44'25,65" E
Timavo	Timavo	J	Monfalcone	IT	TIM	TIM1	5	12.8.10	45°47'13,81" N, 13°35'26,76" E
Zrmanja	Zrmanja	J	Velebit	HR	ZRM	ZRM2	5	13.11.09	-



Slika 4: Zemljevid lokalitet v Sloveniji

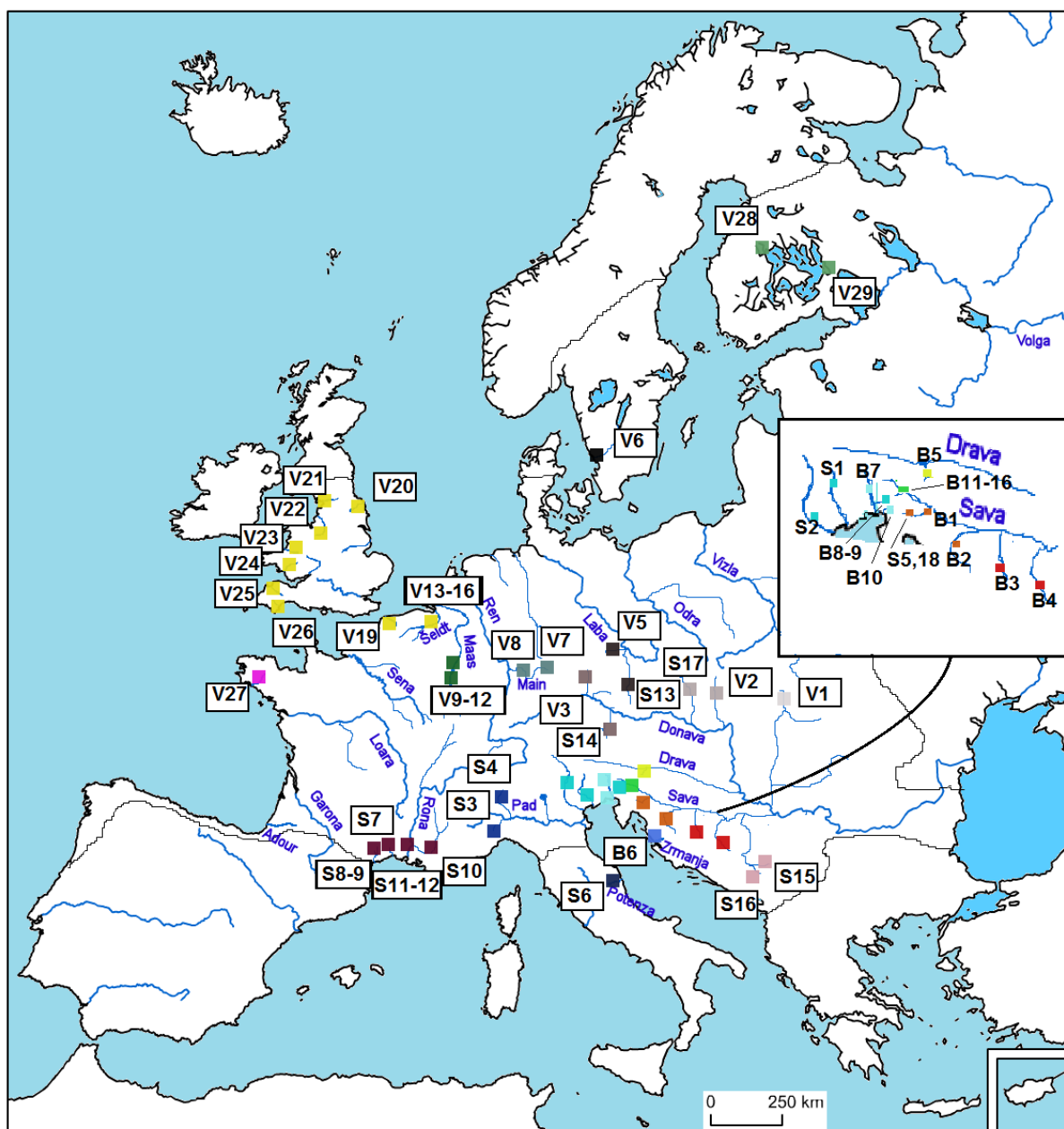
Preglednica 3: Seznam haplotipov, katere smo uporabili v analizah

Oz. lok. Zem.	Povodje	Reka	Koordinate	Haplotipi	KLAD
V1	Donava	Ulicka	22° 27'E 48° 57'N	HV3, HV4	I
V2	Donava	Turiec	18° 51'E 48° 54'N	HV1, HV2	I
V3	Donava	Otterbach	12° 15'E 49° 01'N	HV5	I
V4	Scorff	Scroff	3° 24'W 47° 57'N	HV6, HV7	VII
V5	Elbe	Enziusbach	11° 44'E 50° 12'N	HV8, HV9, HV10, HV11	I
V6	Nybroan	Kullean	13° 52'E 55° 31'N	HV12, HV13	I
V7	Rhine(Main)	Thiemitz	11° 32'E 50° 04'N	HV14, HV15	I
V8	Rhine(Main-Donau Kanal)	Aufsess	11° 15'E 49° 50'N	HV16, HV17	I
V9	Maas	Perlbach	6° 14'E 50° 33'N	HV28	III
V10	Maas	Veurs	5° 49'E 50° 45'N	HV29	III
V11	Maas	Aisne	5° 32'E 50° 23'N	HV30	III
V12	Maas	Lesse	5° 10'E 49° 60'N	HV31	III
V13	Scheldt	Witte Nete	5° 06'E 51° 14'N	HV21, HV32	IV
V14	Scheldt	Molenbeek-Zwalm	3° 44'E 50° 47'N	HV35	IV
V15	Scheldt	Molenbeek-Maarkebeek	3° 41'E 50° 48'N	HV41	IV
V16	Scheldt	Pitrebais	4° 44'E 50° 45'N	HV36	IV
V17	Scheldt	Trouille	4° 00'E 50° 24'N	HV37, HV38	IV
V18	Scheldt	St-Georges	3° 31'E 50° 15'N	HV39, HV40, HV41, HV42, HV43, HV44,	IV
V19	Aa	Aa	2° 03'E 50° 34'N	HV45	IV
V20	Humber	Rye	1° 03'W 54° 14'N	HV46	IV
V21	Ribble	Hodder	2° 31'W 53° 55'N	HV41, HV48, HV49	IV
V22	Dee	Alwen	3° 27'W 53° 00'N	HV41, HV50, HV51	IV
V23	Teifi	Dulas	4° 04'W 52° 07'N	HV52, HV53, HV54	IV
V24	Towy	Cennen	3° 59'W 51° 52'N	HV50	IV
V25	Neet	Neet	4° 30'W 50° 47'N	HV55, HV56	IV
V26	Caerhayes	Caerhayes	4° 50'W 50° 17'N	HV57	IV
V27	Puruvesi	Lake Saimaa	29° 40'E 61° 55'N	HV58	II
V28	Yla-Keitele	Keiharinokoski	25° 35'E 63° 05'N	HV59	II
S1	Adriatic Sea	Livenza	46° 02'E 12° 29'N	Cot24, Cot29, Cot34	8
S2	Adriatic Sea	Brenta	45° 56'E 11° 43'N	Cot31, Cot32, Cot33	5
S3	Po	Po	44° 42'E 7° 27'N	Cot11, cot13, cot63	16
S4	Po	Toce	46° 06'E 8° 18'N	Cot64	17
S5	Donava	Kolpa	45° 27'E 14° 51'N	Cot20, Cot21	23
S6	Potenza	Campodonico	43° 13'E 12° 51'N	Cot58	9
S7	Mediteran	Lez	43° 42'E 03° 51'N	Cot10	27
S8	Harault	Arre	43° 58'E 03° 31'N	Cot47	28
S9	Harault	Foux de Brissac	43° 52'E 3° 42'N	Cot2 Cot3, Cot4	31
S10	Rhone	Sorgues Vaucluse	43° 55'E 4° 59'N	Cot6	30
S11	Rhone	Chassezac	44° 25'E 4° 17'N	Cot71, Cot72	33
S12	Rhone	Ceze	44° 11'E 4° 31'N	Cot7, Cot8, Cot9	34
S13	Elba	Dluhostsky potok	48° 52'E 14° 47'N	Cot1	39
S14	Donava	Lammer	47° 35'E 13° 19'N	Cot59	21
S15	Drina	Tara	42° 49'E 19° 31'N	Cot16, Cot17	25
S16	Drina	Pcinja	42° 48'E 19° 26'N	Sut1, Cot16, Cot17,	26
S17	Donava	Punkva	49° 21'E 16° 42'N	Cot69	42
S18	Donava	Tounjica	45° 14'E 15° 13'N	Cot40, Cot41, Cot42, Cot43	24

se nadaljuje...

...nadaljevanje

Oz. lok. Zem.	Povodje	Reka	Koordinate	Haplotipi	KLAD
B1	Kupa	Petrinjcica	°E °N	Pet1	
B2	Sava	Una	°E °N	Una1, Una3	
B3	Sava	Vrbas	°E °N	Jaj1, Jaj3	
B4	Sava	Bosna	°E °N	Kas1	
B5	Drava	Mislinja	°E °N	Mis1	
B6	Adriatic Sea	Zrmanja	°E °N	Zrm1, Zrm2	
B7	Adriatic Sea	Soča	°E °N	Soc2, Soc3, Soc5	
B8	Soča	Hubelj	°E °N	Hub1, Hub2	
B9	Adriatic Sea	Rižana	°E °N	Riz4	
B10	Adriatic Sea	Timavo	°E °N	Tim1	
B11	Donava	Sava	°E °N	Bor1	
B12	Sava	Hribski potok	°E °N	Hri1	
B13	Sava	Cerkniščica	°E °N	Lov1	
B14	Sava	Iščica	°E °N	Pod2	
B15	Sava	Radovna	°E °N	Rad2, Rad6	
B16	Sava	Gračnica	°E °N	Gra5	



Slika 5: Zemljevid lokalitet iz katerih haplotipe smo uporabili v analizah (oznake se ujemajo z imeni in opisi v preglednici 3, z oznako S so lokalitete haplotipov pridobljenih iz raziskave Šlechtova in sod. 2004, z oznako V so lokalitete haplotipov pridobljenih iz raziskave Volckaert in sod. 2002, z oznako B so označene lokalitete haplotipov lastne raziskave, barve lokalitet se ujemajo z oznakami na drevesih (slike 7,8,9)

2.2. METODE

2.2.1. Priprava vzorcev in izolacija DNA

DNA smo izolirali iz tkiva prsne plavuti (približno 5 mm²).

Vzorce smo lizirali po naslednjem postopku, opisanem v Miller in sod (1988):

- V mikrocentrifugirko z vzorcem se doda 600µl ekstrakcijskega puфра (0,5 M Tris, 0,1 M EDTA, 2 % SDS, pH 8,8) in 5 µl proteinaze K (50 µg/ml).
- Vsebina se pretrese in inkubira pri 55°C 3 ure oz. pri 50°C 24 ur.
- Ko se plavut razgradi, se suspenzijo ohladi na ledu.
- Doda se 350 µl 5M ohlajenega amonijevega acetata in dobro premeša.
- Sledi 15 min centrifugiranja pri 17k rcf x g (centrifuga 5417C Eppendorf, Nemčija). Po centrifugiranju so proteini oborjeni na dnu.
- V tekočini raztopljeno DNA se odlije v svežo mikrocentrifugirko.
- Doda se 600 µl izopropanola, ohlajenega na -20°C in počasi brez tresenja premeša. Suspenzijo se za najmanj 30 minut shrani na -20°C, v tem času se DNA obori.
- Centrifugira se 5 minut pri maksimalni hitrosti 27k rcf x g, sledi dekantacija.
- Precipitat se spere s 300 µl 70 % EtOH.
- Centrifugira se 5 min pri maksimalni hitrosti.
- Etanol se odlije oz. previdno odpipetira.
- Sledi cca. 3 min sušenja precipitirane DNA z vakuumsko centrifugo (Eppendorf, Nemčija)
- Posušeno DNA se raztopi v 20 µl destilirane vode.

Uspešnost izolacije smo preverjali na horizontalni elektroforezni enoti (Pharmacia, Švedska) na 1 % agaroznem gelu (FMC, ZDA) v 0,5 x TBE pufri (0,5M Tris baza, 0,5M borna kislina, 10mM EDTA (pH 8,3)). Nanašali smo po 3 μ l nerazredčenega vzorca z dodatkom barvila SYBRSafe (Invitrogen, ZDA). Koncentracijo izolirane DNA smo preverjali s spektrofotometrom NanoDrop2000 (Thermoscientific, USA). Delavno raztopino DNA (cca. 50 ng DNA/ μ l) smo pripravili z redčenjem z ustreznim volumnom ddH₂O. Nerazredčeno DNA smo shranili pri -20°C, delovne raztopine pa v hladilniku.

2.2.2. Pomnoževanje v verižni reakciji s polimerazo (PCR)

Uporabljali smo par oligonukleotidnih začetnikov (LRBT-25 5'-AGA GCG CCG GTG TTG TAA TC-3' in LRBT-1195 5'-GCT AGC GGG ACT TTC TAG GGT C-3'; Uiblein in sod. 2001), ki prilegata na odseka v genih za tRNA fenilalanin in prolin. Po seriji optimizacij smo določili ustrezne koncentracije reagentov za PCR in določili program za pomnoževanje. Pomnoževali smo v cikličnem termostatu GeneAmp PCR2400 (PE AppliedBiosystems).

Reagenti in njihove koncentracije, uporabljeni v 25 μ L PCR:

Primer LT-25 (10mM)	0,75 μ L
Prmer LT-1195 (10mM)	0,75 μ L
dNTP (0.2mM x 4)	1,0 μ L
MgCL ₂ (25mM)	1,5 μ L
10x Taq pufra	4 μ L
FermentesTaq polimeraza (5U)	0,2 μ L
Vzorčne mtDNA	1 μ L
H ₂ O	20,8 μ L

Program za pomnoževanje kontrolne regije mtDNA.

94°C	5 min	}	35X
94°C	45 sec		
54°C	40 sec		
72°C	70 sec		
72°C	7 min		

Za vsak vzorec smo z agarozno elektroforezoin molekularno lestvico velikosti 1kbp »GeneRuler1kbpDNA« (Fermentas, Litva) preverjali koncentracijo in kvaliteto produkta PCR. Nanašali smo 3 µl nerazredčenega vzorca. Produkta PCR smo shranili na -20°C.

2.2.3. Določanje nukleotidnega zaporedja

Obojestransko sekvenciranje PCR produktov so z istima začetnikoma, kot smo ju uporabili pri pomnoževanju, izvedli v podjetju Macrogen (www.macrogen.com). Nukleotidna zaporedja smo preverili na oko in morebitne napake popravili s programom MEGA5 (Tamura in sod. 2011). Nasprotni si sekvenci istega vzorca smo s pomočjo programa ChromasPro 1.5 (Technelysium, Avstralija) spojili. Urejene sekvence analiziranih vzorcev, sekvence referenčnega materiala in sekvence zunanjih skupin smo poenotili glede na dolžino in jih v programu MEGA5 poravnali s pomočjo integriranega algoritma programa ClustalW. S programom Collapse 1.2 (<http://darwin.uvigo.es>) smo združili vsa identična zaporedja in tako pridobili zbirko vseh haplotipov (Preglednica 3).

2.2.4. Nasičenost sekvenc

Nasičenost sekvenc s substitucijami smo preverjali računsko in grafično v programu DAMBE 4.2.13. Indeks substitucijske saturacije ISS (Xia in Lemey 2009) nam računsko, glede na razmerje med opaženimi Iss in simuliranimi Iss.c. vrednostmi, poda teoretično nasičenost substitucij. Program nam je glede na spreminjanje števila opaženih tranzicij in transverzij v odvisnosti od distance med haplotipi, izračunani po modelu TN93, izrisal graf nasičenosti.

2.2.5. Filogenetske in filogeografske analize

S programom jModelTest 0.1 (Posada 2008) smo dobljenim zaporedjem določili najprimernejši model substitucije. Izbira modela je ključna za nadaljnje analize in s tem najbolj verodostojno statistično sklepanje. Modele lahko razumemo kot tolmače filogenetskih informacij naših sekvenc. Na podlagi predpostavk o evoluciji DNA vsak model na svoj način interpretira informacije, ki jih vsebujejo sekvence. Program jModelTest za ovrednotenje modelov uporabi rezultate, pridobljene z metodo največjega verjetja (ML). Za izbor modelov so na voljo različne statistične strategije obdelave informacij (Posada 2009), kot sta »Akaikov informacijski kriterij« (Akaike's information criterion AIC; Akaike 1974) in »Bayesov informacijski kriterij« (Bayesian information criterion BIC; Schwarz 1978).

Drevesa smo iskali z metodo največjega verjetja (ML-maximumlikelihood; Felsenstein 1981) z algoritmom programa PhyML 2.09 (Guindon in Gascuel 2003), ki je sestavni del programskega paketa GeneiousPro 5.5 (Biomatters), in z Bayesovo metodo (Rannala in Yang 1996) s programom BEAST 1.7.1 (Drummond in sod. 2012).

Pri izdelavi drevesa z metodo največjega verjetja (ML) smo uporabili model substitucije TN93+I+G. Nastavili smo tudi število diskretnih kategorij porazdelitve γ (gamma) na 4 in razmerje med tranzicijami in transverzijami na 3:1. Delež nevariabilnih mest zaporedja in parameter α (alfa) porazdelitve γ smo pustili oceniti programu. Iskanje drevesa največjega verjetja je program iskal po metodi zamenjave najbližjih sosedov (nearest neighbor interchange – NNI). Statistično podporo kladov smo ocenili z neparametričnim testom samovzročenja s 1000 ponovitvami.

Bayesovo filogenetsko drevo smo iskali s programom BEAST 1.7.1. (Drummond in sod. 2012). V programsko orodje je pred analizo potrebno vnesti ustrezne evlucijske modele, s katerimi program poskuša izračunati najverjetnejšo statistično rekonstrukcijo evlucijske zgodovine.

Prvi je model substitucije, za katerega smo na podlagi rezultatov jModeltest-a (glej zgoraj) izbrali TN93+I+G.

Drugi je model opisa genealoških odnosov sekvenc drevesa (ang. tree model). Ker gre pri evropskem kaplju za več vrst oziroma populacij, naši vzorci pa niso vzeti iz ene same populacije, smo uporabili nekoalescenčni oziroma speciacijski model. Izbrali smo speciacijski model po procesu Yule (Yule 1924, Gernhard 2008), ki predpostavlja, da ima vsaka linija enako možnost speciacije v katerikoli časovni točki (Nee 2006), število linij v času pa narašča linearno. Kljub temu da ne gre za idealen model, je za naš set podatkov najprimernejši. Model Yule namreč sodi v kategorijo modelov »čista rojstva« (ang. pure birth) in je v primerjavi z modelom »rojstva-smrti« (ang. birth-death) preprostejši. S tem smo se izognili nastavitvi parametrov, ki nam niso znani (velikost populacije itd.), njihove napačne ocene pa bi lahko popačile rekonstrukcijo evolucije.

Tretji je model molekularne ure. Izbrali smo sproščeni model z logaritemsko normalno distribucijo (angl. relaxed lognormal clock), ki se je v preliminarnih analizah izkazal za primernejšega od rigoroznega modela (angl. strict molecular clock model). Sproščeni model predpostavlja, da je med bolj sorodnimi taksoni hitrost molekularne ure podobna, medtem ko dopušča, da se med manj sorodnimi razlikuje. Predpostavlja se, da je sproščeni model bolj verodostojen od rigoroznega modela molekularne ure (Drummond in sod. 2006).

Glede na informacije, ki jih poznamo o uporabljenih sekvencah, lahko v programu modelom določimo začetne verjetnosti oziroma distribucije parametrov (angl. prior probability, skrajšano »prior«). Eden izmed takih je prior modela molekularne ure CTMC (angl. continuous time markov chain rate reference), ki se obnaša diskretno, uporaben pa je za iskanje dreves, kadar nam hitrost molekularne ure ni znana (Ferreira in Suchard 2008). Le-ta prior smo izbrali za določitev parametrov modela molekularne ure.

Analizo programa BEAST smo izvedli v treh ponovitvah po 50 000 000 generacij s frekvenco vzorčenja na vsako 5000 generacijo. S programom LogCombiner smo rezultate vseh ponovitev združili, pri tem pa zanemarili prvih 20 % vzorčenj.

Uspešnost vzorčenja analize smo preverili v programu Tracer 1.5 (Rambaut in Drummond 2009).

V programu Network 4.6 (Fluxus Technologies Ltd., ZDA) smo po postopku »median joining« (MJ) s kriterijem računanja distanc »connection cost« z epsilon vrednostjo 0 (Bandelt in sod. 1999) izrisali mrežo haplotipov. Izdelali smo dve mreži, in sicer v okviru Evrope ter v okviru Slovenije in bližnje okolice. Zaradi velikega areala raziskave in nesimetričnosti tako vzorčenja kot tudi velikosti populacij ter variabilnega števila uspelih identifikacij haplotipov na populacijo smo zanemarili frekvenco posameznega haplotipa in vse obravnavali kot OTU-je (Operational taxonomic unit – operativna taksonomska enota).

3. REZULTATI

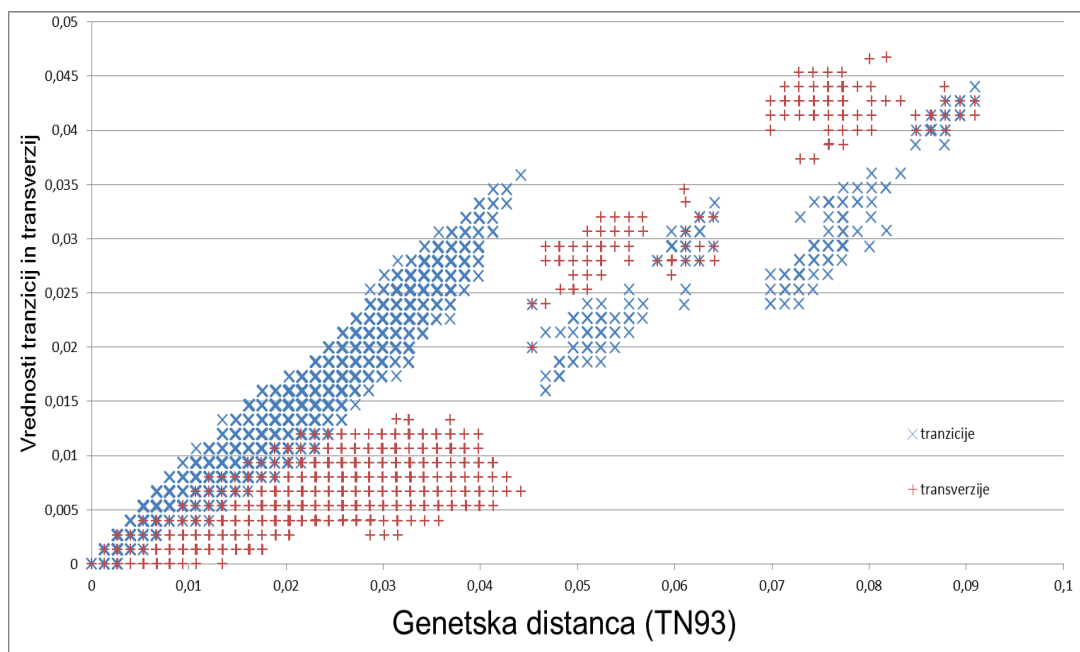
3.1. ZNAČILNOSTI ZAPOREDIJ

Na osnovi poravnave 834 bp dolgih zaporedij CR mtDNA smo med 113 sekvencami našli 28 haplotipov. Od teh jih 27 še ni bilo opisanih. Na območju Slovenije je prisotnih 17 haplotipov (Preglednica 4; deset v zgornji Savi in pritokih, šest v jadranskem povodju in en v dravskem porečju). V zgornjem savskem porečju je bil daleč najpogostejši haplotip BOR1, ki ni vezan zgolj na eno lokaliteto, temveč prevladuje na večini lokalitet v pritokih Save od Ljubljane do Sevnice. Haplotip POD2 predstavlja zaporedje, značilno za holotipno populacijo *C. metae* iz Iščice. Ker smo želeli svoje sekvence primerjati z referenčnimi sekvencami, značilnimi za druge evropske populacije kaplja, ki so na voljo v genski banki, smo sekvence ustrezno prilagodili in posledično skrajšali na 760bp. S tem smo izgubili nekaj genetskega polimorfizma in posledično prepoznali le 26 haplotipov, ki smo jih skupaj s haplotipi iz genske banke uporabili v filogenetskih analizah (Preglednica 3).

Glede na izračune programa jModelTest je bil izbran model TIM1uf +G +I (Posada 2003). Gre za model substitucije, ki je zelo podoben malo preprostejšemu modelu TN93 +G +I (Tamura in Nei 1993), ki ga je program po ustreznosti predlagal kot naslednjega primernega. Ker prvega modela programska oprema, ki smo jo uporabljali za iskanje filogenetskih dreves, ni vključevala, smo v analizah uporabili model TN93 +G +I (Tamura in Nei 1993).

Preglednica 4: Seznam izoliranih vzorcev (haplotipa napisana s sivo barvo sta po krajšanju sekvenc postala identična haplotipu Bor1)

Haplotip	Lokacije (reke)	n
Bor1	Borovniščica, Gameljščica, Litijščica, Medija, Sopota, Rovščica	20
Hri1	Hribski potok, Ponikve v Preserjih	6
Lov2	Lovranovo, Mrzlek, Cerknjščica	11
Pod2	Iščica, Podliščica	5
Gra5	Gračnica	1
Man1	Mangolniški potok	4
Rad2	Radovna	4
Rad6	Radovna	1
Nem4	Nemiljščica	2
Nev2	Nevljica	1
Vrt1	Vrtaški potok	5
Kas1	Kasindoljka, Lepenica	8
Jaj1	Bosna	4
Jaj3	Bosna	1
Pet1	Petrinjčica	1
Una1	Una	4
Una3	Una	1
Mis1	Mislinja	2
Hub1	Hubelj	1
Hub2	Hubelj	3
Soc2	Soča, Tolminščica, Hubelj	6
Soc3	Soča	1
Soc5	Soča	1
Tim1	Timavo	5
Riz4	Rižana	2
Zrm1	Zrmanja	1
Zrm2	Zrmanja	4
Sut1	Sutjeska	5



Slika 6: Graf nasičenosti sekvenc s substitucijami

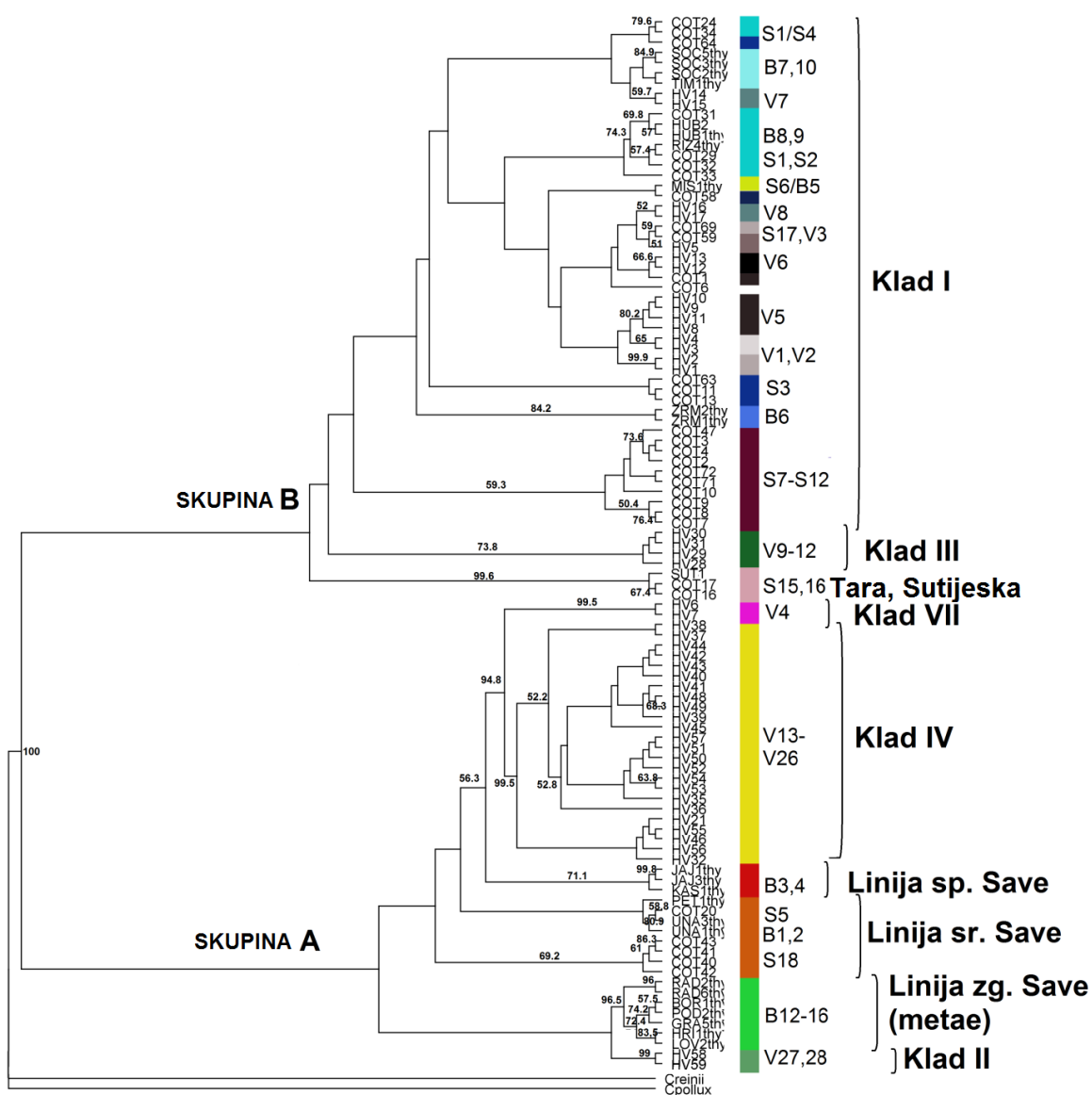
Test substitucijske saturacije sekvenc je podal vrednost $I_{ss}=0,026$, medtem ko so bile simetrične vrednosti 0,727 in asimetrične 0,406. Preko tega smo sklepali, da sekvence niso nasičene. Nasičenost sekvenc je grafično ponazorjena na sliki 6, kjer je razvidno spreminjanje števila tranzicij in transverzij s povečevanjem genetskih razdalj med osebki. Na začetnih vrednostih abscise osi so prikazani odnosi med bolj sorodnimi haplotipi. Tu tranzicije in transverzije naraščajo linearno, kar kaže, da sekvence med sorodnimi haplotipi niso nasičene. Okoli genetske razdalje 0,025 pa število transverzij začne upadati. To gre na račun nižje frekvenca transverzijijskih mutacij. Proti končnim vrednostim abscise osi diagrama so v dveh skupkih združene vrednosti genetskih distanc, ki odražajo primerjavo z zunanjo skupino. Tu je opaziti relativno povečano število transverzij oz. zmanjšano število tranzicij. Do tega naj bi prišlo zaradi povratnih mutacij (nasičenost), ki se začno kopičiti najprej v tranzicijah. Število tranzicij se zaradi tega navidezno in relativno glede na število transverzij zmanjša, kar interpretiramo kot nasičenost.

3.2. FILOGENETSKA DREVESA

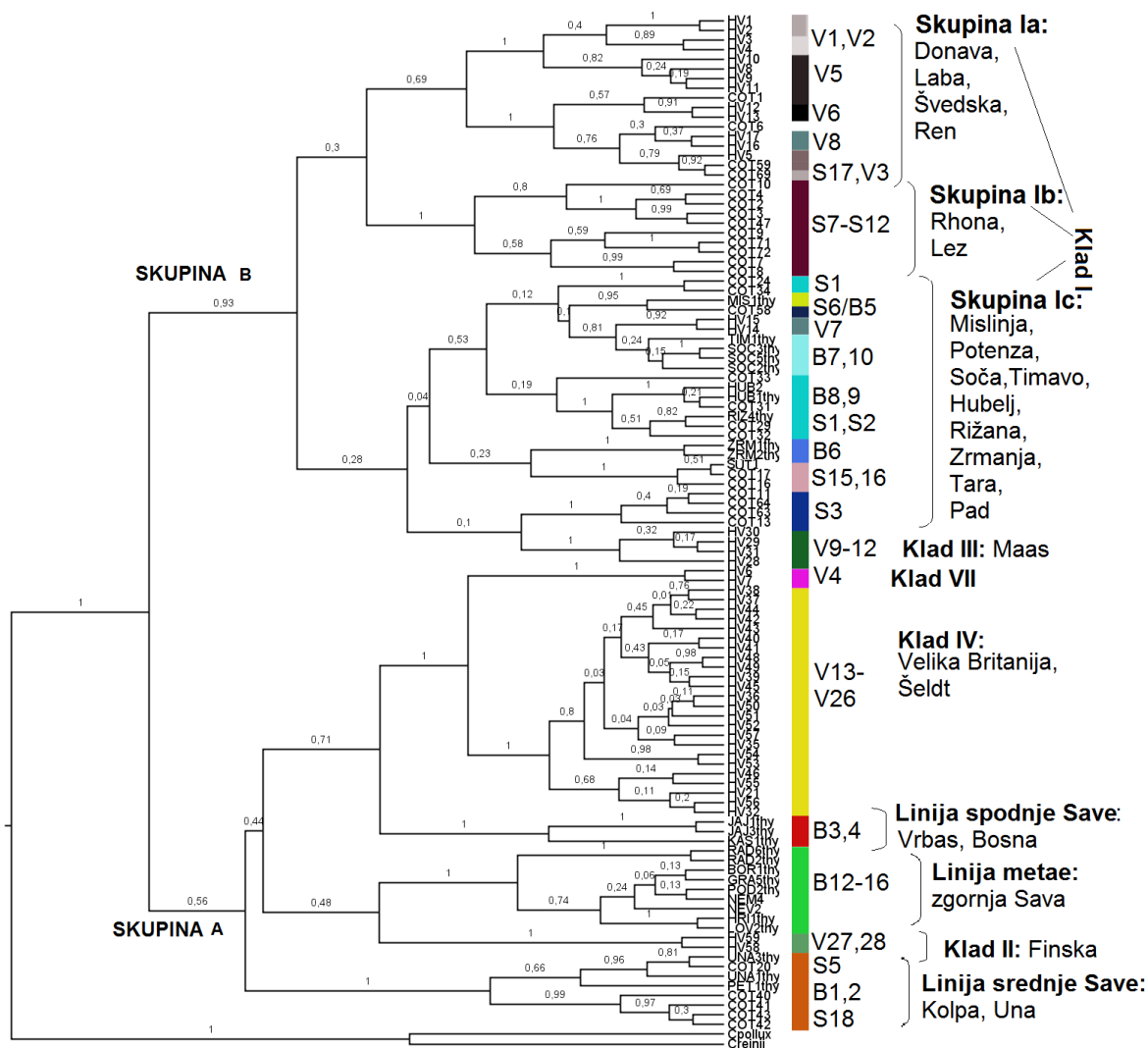
Na vseh drevesih je opazna izrazita divergenca med dvema osnovnima sestrskima skupinama (na drevesih označeni kot A in B; slike 7,8,9). Prvo skupino (A) sestavljajo linija, ki smo jo poimenovali *metae*, klad II, klad IV (Velika Britanija, Šeldt), klad VII (Scroff), linija srednje Save (Kolpa, Tojunčica, Una) in linija spodnje Save (Vrbas, Bosna). Podpora tej skupini (A) je nizka, na filogramu pa je opaziti globoke cepitve vej.

Haplotip POD2 (značilen za *C. metae*) skupaj s haplotipi, ki smo jih našli v populacijah zgornje Save, tvori dobro podprto filogeografsko linijo na vseh drevesih. To linijo smo poimenovali »linija *metae*«. Linija *metae* je statistično visoko podprta distinktivna skupina, razvidna na vseh treh drevesih, ne moremo pa je uvrstiti v noben poimenovan klad. Skupina je sestrski kladu II (finske populacije). Na drevesih sta razvidni tudi linija srednje Save (s haplotipi rek Kolpe, Tojunčice in Une) in linija spodnje Save (s haplotipi rek Vrbasa in Bosne), ki sta statistično dobro podprti. Poimenovane linije so filogeografske linije (glej uvod), katere smo odkrili v tej raziskavi. Poimenovane skupine, ki jih tvorijo tuji haplotipi (iz genske banke), so v tej raziskavi ohranile originalno ime – klad s pripadajočo rimsko številko. Imena smo ohranili zaradi lažje primerjave z originalnimi objavami, predvsem pa ker nekateri poimenovani kladi niso filogeografske linije.

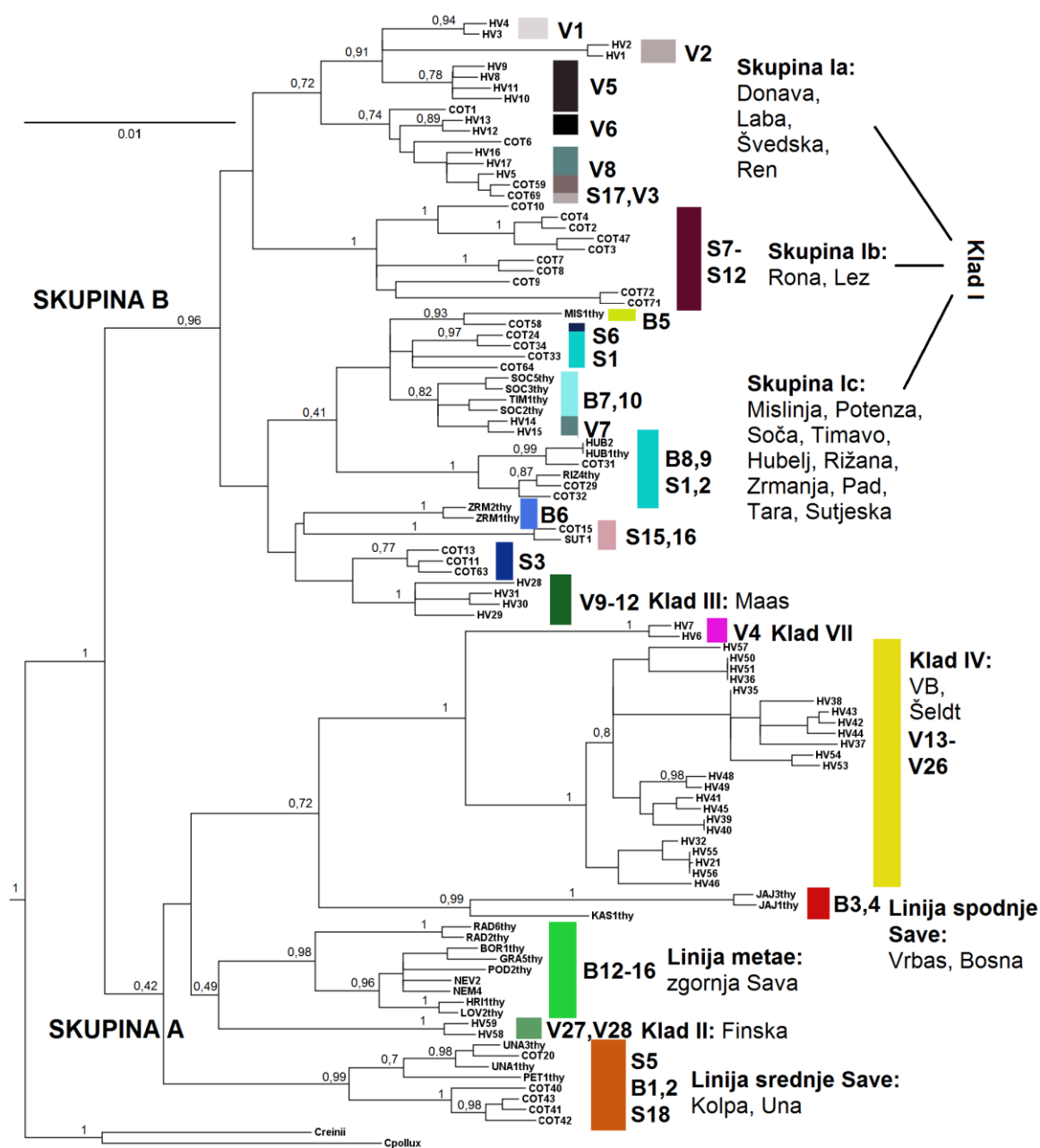
Drugo skupino (B) sestavljata klad III in klad I z še neopisani haplotipi rek Zrmanje, Soče, Hublja, Timave, Mislinje, Sutjeske in Tare. Ta skupina (B) je v primerjavi s sestrsko skupino boljše podprta, medtem ko so odnosi znotraj te skupine slabo podprti. Na drevesih je opaziti, da haplotipi južne Francije tvorijo svojo filogeografsko linijo, ta naj bi bila sorodna skupini, ki zajema haplotipe Donave, Labe in Rena. Znotraj skupine B svoj (slabo podprt) klad (sliki 8, 9) sestavljajo haplotipi klada III, Tare, Sutjeske, Mislinje, Rena in haplotipi vseh jadranskih vodotokov. Odnosi znotraj te skupine so nedorečeni, saj med drevesi znotraj nje ni opaziti soskladja. Sicer sta na vseh drevesih haplotipa Tare in Sutjeske sestrski (porečje Drine), a le pri analizi največjega verjetja (slika 7) skupaj s haplotipi klada III predstavljata bazalno skupino kladu I. Haplotip Mislinje je po vseh analizah najsorodnejši haplotipu reke Potenze iz Apeninskega polotoka.



Slika 7: Filogenetsko drevo po metodi ML v programu PhyML (bootstrap vrednosti pod 50 niso prikazane)



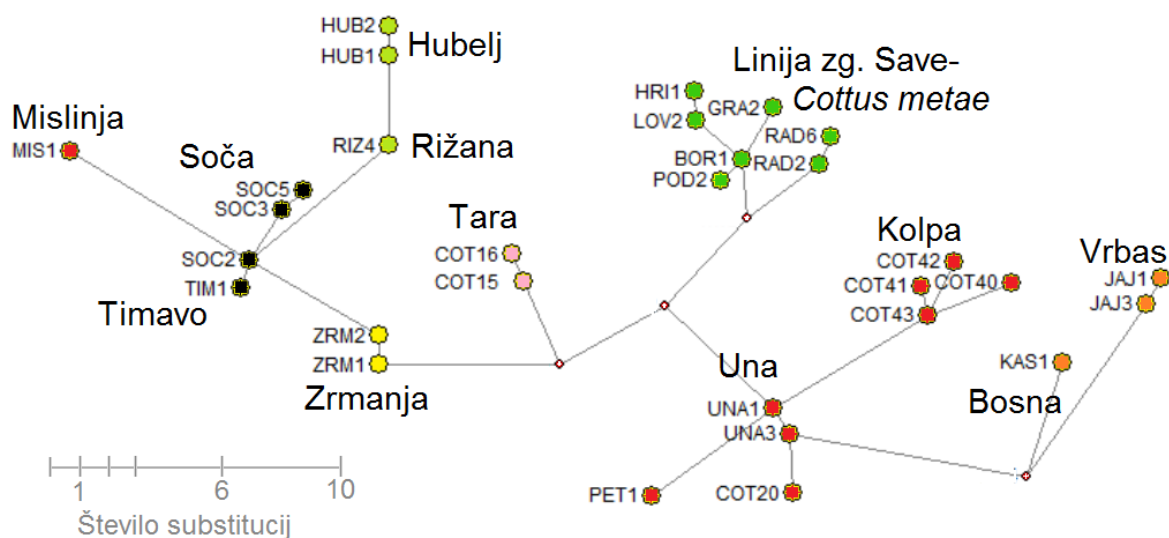
Slika 8: Filogenetsko drevo po Bayesovi metodi izdelano v programu BEAST 1.7.1



Slika 9: Filogram izdelan po Bayesovi metodi v programu BEAST 1.7.1

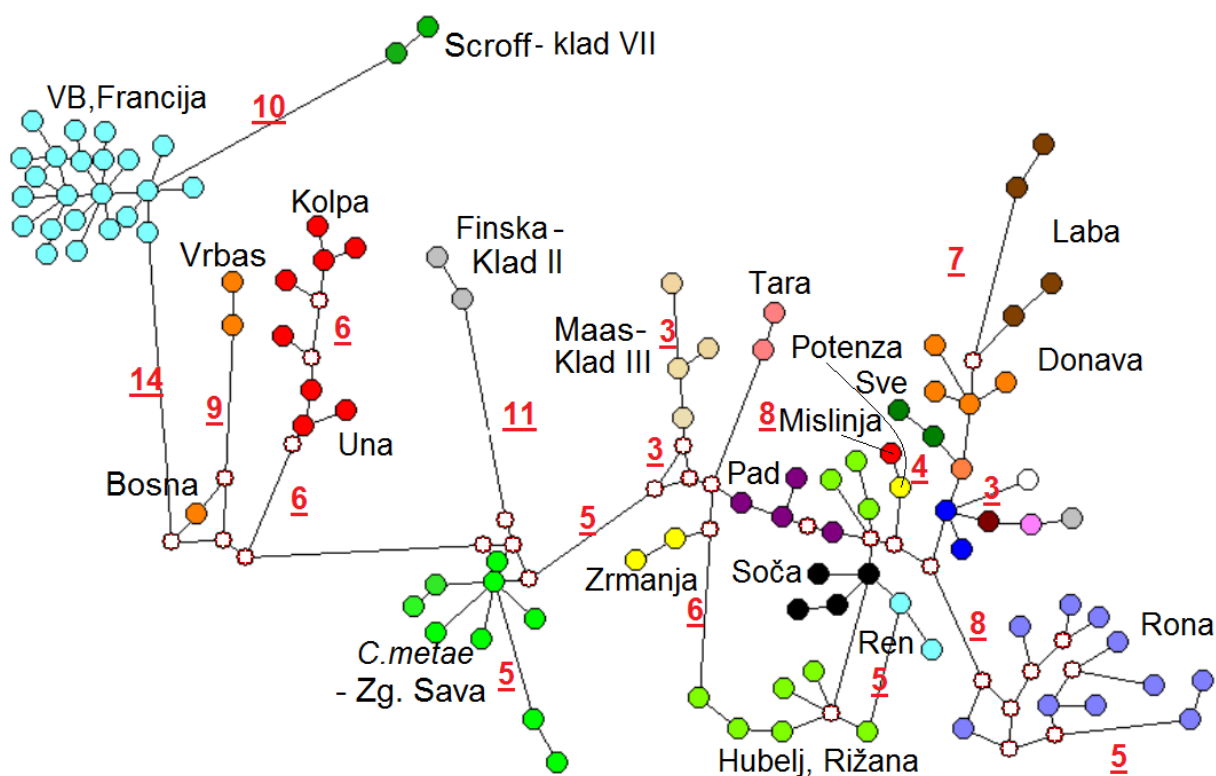
3.3. MREŽNA ANALIZA HAPLOTIPOV

V mreži haplotipov iz Slovenije in bližnje okolice (slika 10) je jasno vidna fragmentacija v več skupin. Tako sistem Save naseljujejo linije zgornje Save (linija metae), Bosne in Vrbasa (linija spodnje Save), Kolpe in Une (linija srednje Save) ter Tare in Sutjeske (Drina). Med temi skupinami so povezave razjasnjene le s pomočjo teoretičnih skupnih prednikov (hipotetični haplotip) ter večjega števila substitucij. Na levi strani mreže pa najdemo jadranske haplotipe in edini dravski haplotip (MIS1). Med njimi ni hipotetičnega skupnega prednika. Povezava med jadranskimi in savskimi haplotipi je hipotetični haplotip, najsorodnejši haplotipom Zrmanje in Tare.



Slika 10: Mreža haplotipov Balkana izrisana v programu Network 4.6 (shema se barvno ne ujema s shemo filogenetskih dreves in lokalitet)

V obsežnejši analizi (slika 11), ki je vključevala tudi haplotipe prejšnjih študij in zajela skoraj celotno Evropo, se na sredini mreže nahajajo filogeografske linije Balkana (metae, Sr. Sava, Sp. Sava). Povezane so prek večjega števila hipotetičnih haplotipov med njimi pa je v primerjavi s preostankom mreže več substitucij. V eno smer iz tega »središča« mreže izhaja jasno razviden klad IV (Velika Britanija, Šeldt). Nanj se navezujejo haplotipi klada VII (Scroff). Na drugi strani mreže pa se prek haplotipov linije metae in več hipotetičnih prednikov prvi navezujejo haplotipi jasno razvidnega klada II. Na isti način se na haplotipe metae navezujejo haplotipi klada III. Iz hipotetičnih prednikov mreža prek povezave Tara – Zrmanja prehaja v jadranske haplotipe. V tem delu mreže je vidnih več hipotetičnih skupnih prednikov, med katerimi je malo substitucij. Iz haplotipov Zrmanje se mreža nadaljuje do haplotipov Hublja in Vipave ter naprej do Soče in Timave. Haplotip značilen za vzorce iz Timave, se od najpogostejšega haplotipa jadranskega povodja-Soc2 razlikuje le v eni substituciji. Presenetljivo iz istega haplotipa (Soc2) prek ene substitucije izhajata haplotipa zgornjega Rena (V7). V krožni povezavi se prek več skupnih prednikov med Sočo in Zrmanjo navezujejo tudi haplotipi reke Pad. Mreža se nato nadaljuje do hipotetičnega haplotipa, iz katerega izhaja haplotip Potenze. Prek štirih substitucij se nanj navezuje haplotip Mislinje. Gre za predstavnika očitno zelo sorodnih populacij, med katerima je geografska razdalja precejšna, poleg tega pa sodita v različni povodji. Ta del mreže, z izjemo Mislinje in Rena, lepo zaključuje geografsko enoto jadranskega povodja. V nadaljevanju se mreža cepi na dve skupini. Prvo predstavljajo haplotipi Rone in ostalih rek južne Francije, med katere sodi tudi haplotip reke Lez. Druga skupina pa se prek renskih haplotipov lokacije V8, ki se nahaja v umetnem kanalu med Donavo in Renom, nadaljuje v haplotipe Donave, Labe in švedskih rek.



Slika 11: Mreža evropskih haplotipov izrisana v programu Network 4.6 (Rdeče podčrtane številke predstavljajo število mutacij med dvema haplotipoma, rdeče obrobljeni beli krogi predstavljajo hipotetične haplotipe, shema se barvno ne ujema s shemo filogenetskih dreves in lokalitet)

4. RAZPRAVA

4.1. KAPLJI V SLOVENIJI IN BLIŽNJI OKOLICI

Filogenetska analiza kapljev izvedena na CR mtDNA je razkrila obstoj filogeografske linije, ki sovпада s predlaganim arealom vrste *C. metae*. Odkritje omenjene linije, ki poseljuje zgornji del Save (od izvirov do pritoka Kolpe) in je po Freyhofu (2005) morfološko opredeljena kot nova vrsta, je v naši raziskavi najpomembnejše. Znotraj areala te linije nismo našli haplotipov, ki bi pripadali drugim linijam, prav tako pa na ostalih lokacijah širom Evrope nismo zasledili haplotipov, ki bi pripadali liniji *metae*. To kaže, da je *C. metae* slovenski endemit, natančneje endemit zgornjega toka reke Save s kontinuiranim arealom. Ugotavljamo torej, da molekularni rezultati, ki jih predstavljamo, ne nasprotujejo obravnavanju barjanskega kaplja kot samostojne vrste.

Zanimivo je, da se naše ugotovitve ne skladajo z rezultati Šlechtove in sod. (2004), ki so analizirali po nekaj osebkih iz Iške in Iščice (več o tem v uvodu). V Iščici so namreč odkrili haplotip, ki smo ga mi našli le v reki Timavi (TIM1, n=10; jadransko povodje). Haplotip TIM1 se od najpogostejšega haplotipa jadranskega povodja SOC2 razlikuje le v eni substituciji. S tem so holotipsko populacijo *C. metae* uvrstili v klad I. V Iški naj bi isti avtorji našli haplotip, ki smo ga mi našli le v Iščici (ISC6). Nenavadno se nam je zdelo, da naj bi se prav kaplji iz Iščice, ki predstavljajo holotipski vzorec za *C. metae*, glede na mtDNA razlikovali od vseh preostalih populacij zgornje Save, ki tvorijo genetsko homogeno enoto. Prav zaradi omenjenega neskladja smo kaplje iz Iščice ponovno vzorčili in dobili rezultate, enake predhodnim. Poleg tega je tudi zanimivo, da v okviru svojega vzorčenja kljub intenzivnemu in večkratnemu iskanju kapljev v Iški, teh tam nismo našli.

Glede na omenjene pomisleke in ugotovitve domnevamo, da je pri Šlechtovi in sod. (2004) prišlo do netočnosti pri opredeljevanju lokalitet in s tem do napačne filogenetske umestitve kapljev iz Iščice.

V tej raziskavi morfoloških analiz nismo opravljali, lahko pa komentiramo prisotnost bodcev kot določevalnega znaka za vrsto *C. metae*. Bodcev nismo opazili v populacijah, ki smo jih vzorčili na lokalitetah srednje in spodnje Save, Mislinje (dravsko porečje) ter vseh rekah jadranskega povodja, opazili pa smo jih v zgornji Savi, vendar ne pri vseh osebkih. Na podlagi lastnih izkušenj z bodci in ob upoštevanju molekularnih rezultatov torej predpostavljamo, da bi lahko vse populacije v Sloveniji, pri katerih najdemo osebke z bodci, pripadale vrsti *C. metae*. Vendar pa odsotnost bodcev ne pomeni, da osebki brez njih ne pripadajo tej vrsti.

V Sloveniji sta poleg zgornjesavske linije *metae* prisotni še dve skupini kapljev. Najobsežnejša skupina, ki sodi v klad I, zajema haplotipe jadranskih rek (Soča, Hubelj, Rižana itd.) ter haplotip MIS1, ki smo ga kot edinega našli v Mislinji. Omenjeni haplotip je zelo soroden s haplotipom iz reke Potenze, oba pa, kot omenjeno spadata v skupino, kjer prevladujejo jadranski haplotipi (Ic, sliki 8 in 9). Prisotnost tako sorodnega haplotipa jadranskim v Mislinji ni tako nepričakovana, saj je bil prehod kaplja preko gorskih masivov že dokazan (Šlechtova in sod. 2004). Druga skupina tvori linijo srednje Save. Pri nas smo jo našli samo v Kolpi, haplotipe te skupine pa najdemo tudi v Uni. Kapljev iz Kolpe na podlagi mtDNA torej ne moremo uvrstiti v vrsto *C. gobio*, kot na podlagi morfologije predlaga Freyhof s sodelavci (2005).

Iz naše raziskave je razvidno, da je v arealu evropskega kaplja območje Dinaridov eno izmed najbolj heterogenih. Tu smo odkrili številne neopisane haplotipe klada I kot tudi tri do danes še neopisane filogeografske linije. Tako je poleg linij metae in srednje Save prisotna še linija spodnje Save, katere haplotipe smo našli v Vrbasu in Bosni. Filogenetski status kapljev iz Tare in Sutjeske (Cot16, Cot17, SUT1; porečje Drine) težko komentiramo, saj se glede na različne analitične pristope njihova umestitev na drevesu spreminja. Kot je razvidno iz mreže haplotipov, je ta linija povezovalni člen med kladom I ter preostalimi linijami Dinaridov (linija metae, linija srednje Save in linija spodnje Save).

4.2. POMEN BALKANSKEGA POLOTOKA PRI KOLONIZACIJI EVROPE

Balkanski polotok tako za rastlinske kot živalske vrste predstavlja enega izmed najbolj vrstno bogatih območji v Evropi. To je posledica raznolikosti regije, kompleksne geološke zgodovine in interakcij med populacijami, vrstami in ekosistemi (Čurčič 2008). Večina današnjih evropskih sladkovodnih rib izvira iz Azije, ki so Evropo naselile prek Paratetide (Weiss in sod. 2002, Šediva in sod. 2008, Nesbo in sod. 1999, Banarescu 1991). Glede na naše rezultate, ki kažejo veliko heterogenost haplotipov in filogenetskih linij tega območja, lahko sklepamo, da enako velja tudi za kaplja, saj so se izvirne populacije te prve evropske kolonizacije na zahodnem Balkanu ob odsotnosti glaciacij ohranile do danes.

V zadnjih dveh milijonih let je temperatura na Zemlji ciklično naraščala in padala, kar je imelo za posledico glacialne ter interglacialne. To obdobje je imelo močan vpliv na mnoge vrste in njihovo današnjo distribucijo (Hewitt 2004). Pri vodnih živalih je zaradi dvodimenzionalnosti vodotoka in vezanosti na rečno strugo, ki se spreminja v času, umik populacij pred neugodnimi razmerami težavnejši, s tem pa možnost in pogostnost izumrtja višja kot pri kopenskih živalih (Avice in sod. 1998). Biota, ki je med obdobji neugodnih razmer preživela v zatočiščih, je lahko ob ponovnem prihodu ugodnih razmer rekolonizirala prej poledenela območja (Stewart in sod. 2009). Raziskave na kaplju so ene izmed prvih potrdile obstoj severnih zatočišč, ki se nahajajo izven južnih polotokov Evrope. Gre za neke vrste mikrozatočišča, ki v severnejših zemljepisnih širinah omogočajo preživetje hladnoljubnim vrstam (Rull 2009). V nadaljevanju bomo na podlagi svojih analiz podali poizkusno retrospektivo kolonizacijske zgodovine evropskega kaplja. Predlagan scenarij se v določenih aspektih razlikuje od že znanih kolonizacijskih teorij (Englbrecht in sod. 2000, Volckaert in sod. 2002).

Rod *Cottus* naj bi izviral iz jugovzhodnih obal Azije (Sideleva 1994). Na tej osnovi sklepamo, da je bila Evropa kolonizirana iz vzhoda (Englbrecht in sod. 1998, Volckaert in sod. 2002), kar naj bi se na podlagi fosilnih ostankov zgodilo med pliocenom (Costedoat in Gilles 2009). Kot smo ugotovili v svoji raziskavi, evropskega kaplja ločimo na dve osnovni sestrski skupini A in B. Glede na geografsko distribucijo kladov in areale haplotipov teh dveh skupin sklepamo, da vsaka od skupin predstavlja svoj kolonizacijski val. Najprej naj bi Evropo kolonizirali predstavniki skupine A, nato pa naj bi območja, iz katerih so le-ti izginili, kolonizirali predstavniki skupine B. Dva različna kolonizacijska vala predlaga tudi Volckaert in sod. (2002). Vendar za razliko od njihovih predpostavk

naše analize ne podpirajo bazalnosti klada I vsem ostalim skupinam evropskega kaplja (slika 7). Le-ta po naših analizah najverjetneje sodi v drugi kolonizacijski val skupaj z ostalimi predstavniki skupine B. Prav tako populacije klada III niso prisostvovala pri kolonizaciji Velike Britanije in Šeldta, saj so le-te posledica prvega kolonizacijskega vala, populacije klada III pa posledica drugega kolonizacijskega vala.

Iz naših rezultatov je razvidno, da je zahodni Balkan najverjetneje služil kot odskočna deska za vse nadaljnje kolonizacije evropskih rek. To območje današnjih dinaridov je bilo začasa Paratetide kot otok izolirano od celinske Evrope (Popov in sod. 2006). Ob ponovni združitvi s celino, pa je kapelj od tu najverjetneje rekoloniziral današnjo Evropo. Populacije, ki so danes živeče potomke prvega kolonizacijskega vala, tvorijo klade II, IV, VII ter filogeografske linije metae (zg. Sava), spodnje Save (Vrba in Bosna) in linijo srednje Save (Kolpa in Una). Kolpa je bila kot območje z edinstveno evlucijsko linijo opisana tudi pri raku koščaku (*Austropotamobius torrentium*). Kanjon Kolpe je opisan kot prej še neznan zatočišče zahodnega Balkana v obdobju pleistocena (Trontelj in sod. 2005). V prvem kolonizacijskem valu se je najverjetneje ravno linija srednje Save širila po Evropi. Kapelj je lahko od tu tako v eno smer koloniziral zgornjo Savo (linija metae), v drugo smer pa se je prek spodnje Save (Vrba in Bosna) najverjetneje po Donavi razširil po vsej Evropi, vse do Velike Britanije (klad IV) in francoske Bretanije (klad VII). Linija metae je na drevesih (slike 7,8,9) razvidna kot sestrski kladu II (reke od Poljske pa vse do Finske). Zanimivo je, da so za linijo metae in za klad II značilni bodci. Volckaert in sod. (2002) so sicer predlagali, da se je klad II razvil neposredno iz klada I, česar na podlagi naših rezultatov ne moremo potrditi.

Sklepamo, da je kmalu po prvemu kolonizacijskemu valu prišlo do močne ohladitve, s tem pa do izumrtja populacij kapljev, ki so bile izven zatočišč. Iz izsledkov te raziskave je opaziti, da danes živeče potomce prve kolonizacije najdemo na obrobjih historičnega areala.

V nadaljevanju sklepamo, da je temu glacialnemu obdobju sledil interglacial, primeren za ponovno kolonizacijo. V tem obdobju in sledečih interglacialih so predniki skupine B kot drugi kolonizacijski val rekolonizirali Evropo. Odnosi znotraj te skupine so v naši analizi slabše podprti, vendar pa je iz mrežne analize (slika 11) in drevesa največjega verjetja (slika 7) razvidno, da je bil najbrž ravno klad, katerega haplotipe smo našli v Tari in Sutjeski, ključen pri rekolonizaciji Evrope. Verjetno je kolonizacija potekala prek Donave po isti kolonizacijski poti kot pri prvem valu. Tokrat pa je kaplju uspelo kolonizirati tudi Rono (skupina Ib) ter reke Severne Italije (skupina Ic). Splošno sprejeta teorija je, da se je kapelj iz sistemov Rone, Rena in Donave prek Alp širil v vodotoke severne Italije (Šlechtova in sod. 2004). Iz naše interpretacije rezultatov, predvsem mrežne analize haplotipov, podajamo alternativno teorijo kolonizacije jadranskih vodotokov, in sicer iz linije, ki je najverjetneje poseljevala porečje Drine, haplotipe značilne za le-to pa smo našli v Tari in Sutjeski. Sklepamo, da bi se kaplji lahko širili prek izvirnih delov Sutjeske in okoliških pritokov Drine v izvirne dele Neretve. Ta premostitev Dinaridov bi se lahko zgodila na isti način kot premostitev Alp, kot jo opisujejo Šlechtova in sod. (2004). Vzorcev iz Neretve sicer nimamo, sklepamo pa, da bi se je kapelj od tu lahko širil v Zrmanjo.

Iz rezultatov je razvidno, da je Zrmanja bazalna vsem haplotipom jadranskega povodja. Na podlagi tega sklepamo, da se je za časa Prapada kapelj iz Zrmanje širil po toku navzgor do izvirmih delov Pada. Ob tem je verjetno naselil tudi desni pritok Prapada Potenzo ter vse ostale pritoke. Prapad je bila reka, ki je obstajala v času ledenih dob. Ko so bile velike količine vode ujete v ledu, se je gladina Jadranskega morja ponekod znižala tudi do 100 m in več (Trincardi in Correggiari 1998), tako se je Prapad verjetno izlival v Jadransko morje šele v južni Dalmaciji, kjer se globina morja bistveno poveča. Reke, ki se danes neposredno izlivajo v severni in srednji del jadranskega morja, so bile za časa Prapada njegovi pritoki. Odsotnost kapljev v jadranskih vodotokih, ki so nižje od izliva Prapada (Drim, Bojana itd.) in s tem nikoli niso bili v sladkovodni povezavi z njim, podpira teorijo o Prapadu kot koridorju kolonizacije jadranskega povodja. S to hipotezo ne nasprotujemo teoriji Šlechtove in sod. (2004) o prečkanju kaplja prek Alp (glej uvod); ravno nasprotno, tudi v svoji raziskavi na primeru Mislinje odkrivamo, da naj bi bilo dravsko porečje relativno recentno kolonizirano prek jadranskega zatočišča. Prav tako bi lahko kaplji prek Pada kolonizirali tudi Rono, kar je ravno obratno, kot se je predpostavljalo v prejšnjih raziskavah (Šlechtova in sod. 2004).

5. SKLEPI

- Rezultati pričujoče raziskave podpirajo obstoj na novo opisane vrste *C. metae*.
- Kapelj je v Sloveniji genetsko precej heterogen, saj smo poleg *C. metae* našli v okviru *C. gobio* še dodaten genetski polimorfizem klada I, še neopisano linijo srednje Save, ki je na osnovi rezultatov CR mtDNA ne moremo uvrstiti niti v *C. metae* niti v *C. gobio*.
- Na področju Save je bila poleg linije srednje Save odkrita še linija spodnje Save, za kateri domnevamo, da bi lahko predstavljali samostojni vrsti.
- Zahodni Balkan je za kaplja najverjetneje služil kot odskočna deska pri kolonizaciji Evrope, ki naj bi potekala v dveh valih.
- Prapad je najverjetneje služil kot kolonizacijski koridor za jadransko povodje in se iz tega zatočišča prek Alp širil v mediteranske reke južne Francije.

6. POVZETEK

Evropski kapelj je zaradi relativne starosti linij, velikega areala in ekonomske nepomembnosti primeren za ugotavljanje zgodovinskih kolonizacijskih poti. V Sloveniji je bila na območju Save opisana vrsta *Cottus metae*, ki naj bi pokrivala areal zgornje Save (od njenih izvirov do sotočja s Kolpo). Njeno določanje temelji na prisotnosti okostenelih ostankov lusk – bodcev pod prsno plavutjo. V raziskavi smo želeli tudi na molekularnem nivoju opredeliti domnevno evolucijsko edinstvenost populacij zgornje Save in jih umestiti v evropski prostor.

Filogenetske analize smo opravili na podlagi kontrolne regije mitohondrijske DNA (CR mtDNA). Sorodstvene odnose med 107 haplotipi kaplja smo ugotavljali z metodama največjega verjetja (ML) in Bayesovo metodo. Drevesa smo koreninili s homolognima zaporedjema vrst *C. reinii* in *C. pollux*. Filogeografska analiza je bila izvedena z mrežno analizo haplotipov.

Rezultati so pokazali, da kaplji v arealu zgornje Save pripadajo lastni filogeografski liniji. Ta linija je jasno ločena od vseh že znanih evropskih kladov, njena edinstvenost pa sovпада z morfološko definirano vrsto *C. metae*. Reke jadranskega povodja in dravskega porečja poseljujejo populacije vrste *C. gobio* s haplotipi, ki pripadajo evropsko splošno razširjenemu kladu I. Haplotipi kapljev v Kolpi pa skupaj s haplotipi, ki smo jih našli v reki Uni, tvorijo lastno filogeografsko linijo.

Kljub morfološki opredelitvi teh populacij za vrsto *C. gobio* (Freyhof in sod. 2005), kapljev iz Kolpe na podlagi mtDNA ni mogoče uvrstiti v to vrsto, ravno tako pa tudi ne v vrsto *C. metae*. Predpostavljamo, da gre za novo vrsto.

Balkan se je tako kot že pri veliko živalskih in rastlinskih vrstah tudi pri kaplju izkazal za izredno heterogeno območje. Tako smo nizvodno po Savi v porečjih Bosne in Vrbasa odkrili še tretjo neopisano filogeografsko linijo, linijo spodnje Save. Še nižje v pritokih Drine (Tara in Sutjeska), zadnjem večjem pritoku Save, pa smo našli linijo, ki sicer sodi v klad I.

Kot kaže, je bil zahodni Balkan ključen pri kolonizaciji kapljev v Evropi. Na osnovi lastnih in predhodnih rezultatov smo oblikovali teorijo dveh ločenih kolonizacijskih valov. Potem ko so kaplji iz Azije prek Paratetide prišli na območje današnjih Dinaridov, se je kasneje od tu kapelj širil po Evropi vse do Velike Britanije in severozahoda Francije. Najverjetneje zaradi ledene dobe je večina populacij tega prvega kolonizacijskega vala izginila. Ostale so le linije, ki so preživele v zatočiščih in sicer v severnem zatočišču na severozahodu Francije (klad IV in klad VII), v zatočišču na vzhodu Evrope (klad II) ter kaplji na Balkanskem polotoku. Ravno iz zatočišča balkanskega polotoka so se kot drugi kolonizacijski val zopet širili po Evropi. Tokrat so kolonizirali tudi jadransko povodje in mediteranske reke južne Francije.

7. LITERATURA

- Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions Automatic Control*, 19: 716-723
- Avise J., Walker D., Johns G. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 265 (1407): 1707–1712
- Avise J.C. 2000. *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge.
- Banarescu P. 1990. *Zoogeography of Freshwaters, Vol. 1. General Distribution and Dispersal of Freshwater Animals*. Wiesbaden: Aula-Verlag 1990, ISBN 3-89104-480-1
- Banarescu P. 1991 *Zoogeography of Freshwaters, Vol. 2. General Distribution and Dispersal of Freshwater Animals in North America and Eurasia*. Wiesbaden: Aula-Verlag, 1991, ISBN: 3-89104-482-8
- Bandelt H-J., Forster P., Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 1: 37-48
- Bernatchez L., Wilson C.C. 1998. Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Molecular ecology*, 7: 431–452
- Costedoat C., Gilles A., 2009. Quaternary Pattern of Freshwater Fishes in Europe: Comparative Phylogeography and Conservation Perspective. *The open conservation biology journal*, 3: 26-48
- Drummond A.J., Ho S.Y.W., Phillips M.J., Rambaut A. 2006 Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence. *PLoS Biol* 4(5): e88. doi:10.1371/journal.pbio.0040088
- Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology And Evolution* »V Tisku« na <http://mbe.oxfordjournals.org/content/early/2012/02/25/molbev.mss075.full.pdf>
- Englbrecht C.C., Freyhof J., Nolte A., Rassmann K., Schliewen U. Tautz, D. 2000. Phylogeography of the bullhead *Cottus gobio* (Pisces: Teleostei: Cottidae) suggests a pre-Pleistocene origin of the major central European populations. *Molecular Ecology*, 9: 709–722

- Eppe R., Persat H., Beaudou D., Berrebi P. 1999. Genetic variability in scupling (genus *Cottus*) from southern France, with reference to the taxonomic status of an endemic species, *C. petiti*. *Heredity*, 83:533-540
- Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution.*, 17: 368-376
- Ferreira M.A.R., Suchardt M.A., 2008. Bayesian analysis of elapsed times in continuous time Markov chains. *Canadian Journal of Statistics*, 36: 355-368
- Freyhof J., Kottelat M., Nolte A., 2005. Taxonomic diversity of European *Cottus* with description of eight new species. *Ictiological Exploration of Freshwaters*, 16, 2: 107-172
- Gernhard T., Hartman K., Steel M. 2008. Stochastic properties of generalised Yule models, with biodiversity applications. *Journal of mathematical biology*, 57: 713-735
- Griffiths H., Kryštufek B., Reed J. 2004. *Balkan Biodiversity: Pattern and Process in the European Hotspot*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- Guindon S., Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704
- Gum, B., Gross, R., Geist, J., 2009. Conservation genetics and management implications for European grayling, *Thymallus thymallus*: synthesis of phylogeography and population genetics. *Fisheries Manag. Ecol.* 16, 37–51
- Hänfling B., Brandl R. 1998. Genetic differentiation of the bullhead *Cottus gobio* L. across watersheds in Central Europe: evidence for two taxa. *Heredity*, 80, 100–117
- Hänfling B., Hellemans B., Volckaert F.A.M., Carvalho G.R. 2002. Late glacial history of the cold-adapted freshwater fish *Cottus gobio*, revealed by microsatellites. *Molecular Ecology*, 11: 1717–1729
- Hantke R. 1993. *Flußgeschichte Mitteleuropas*. Stuttgart, Ferdinand Enke-Verlag.
- Heizmann, E.P.J. 1992. *Das Tertiär in Südwestdeutschland*. Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde, 33: 1–61
- Hewitt G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 359: 183 - 195
- Kinziger A., Wood R., Neely D. 2005. Molecular Systematics of the genus *Cottus*. *American society of ichthyologists and herpetologists Copeia* pp. 303-311

- Knapen D., Knaepkens G., Bervoets L., Taylor M., Eens M., Verheyen E. 2003. Conservation units based on mitochondrial and nuclear DNA variation among European bullhead populations (*Cottus gobio* L., 1758) from Flanders, Belgium. *Conservation genetics*, 4: 129-140
- Koli L. 1969. Geographical variation of *Cottus gobio* L.(Pisces, Cottidae) in Northern Europe. *Annales Zoologici Fennici*, 6: 353-390
- Kontula T., Kirilchik S., Väinölä R. 2003. Endemic diversification of the monophyletic cottoid fish species flock in Lake Baikal explored with mtDNA sequencing. *Molecular phylogenetics and evolution*, 27: 143-155
- Kontula T., Väinölä R. 2001. Postglacial colonization of Northern Europe by distinct phylogeographic lineages of the bullhead, *Cottus gobio*. *Molecular Ecology*, 10: 1983–2002
- Kottelat M., Freyhof J., 2007, Handbook of european freshwater fishes. , Publications Kottelat str. 503-519 ISBN: 2839902982
- Krejsa R. 1967. The systmatics of the prickly scuplin, *Cottus asper* a polytypic species. *Pacific science*, 21: 241-251
- Lowe J.J., Walker M.J.C. 1997. Reconstructing Quaternary Environments. Addison-Wesley-Longman, London.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16, 1215–1215
- Nee S. 2006. Birth-Death Models in Macroevolution. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37: 1-17
- Nesbo C.L., Fosshem T., Vollestad L.A., Jakobsen K.S. 1999. Genetic divergence and phylogeographic relationships among European perch (*Perca fluviatilis*) populations reflect glacial refugia and postglacial colonization. *Molecular Ecology*, 8: 1387-1404
- Nolte W. A., Sheets H. D. 2005. Shape based assignment tests suggest transgressive phenotypes in natural scuplin hybrids (Teleostei, Scorapaeiformes, Cottidae). *Frontiers in Zoology*, 2:11

- Persat H., Beaudou D., Freyhof J., 1996., The scuplin of the Lez spring (Southern France), *Cottus petiti* (Bacescu and Bacescu-Mester, 1964), one of the most threatened species in Europe. V: Conservation of Endangered Freshwater Fish in Europe, Kirchofer A., Hefti D. (ur.), Birkauer Verlag Basel/Switzerland. Stran 321-328
- Popov S., Shcherba I., Ilyina L., Nevesskaya L., Paramonova N., Khondkarian S., Magyar I. 2006. Late Miocene to Pliocene palaeogeography of the Paratethys and its relation to the Mediterranean. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 238: 91-106
- Posada D. 2003. Current protocols in bioinformatics (Baxevanis, A. D., Davidson, D. B. Page, R.D. M., Petsko, G. A., Stein, L. D., and Stormo, G. D. , ur.) pp 6.5.1-6.5.14, John Wiley & Sons, Inc., New York
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253-1256
- Posada D. 2009. Bioinformatics for DNA sequence analysis, methods in molecular biology 573 , Humana Press, a part of Springer-Business Media, LLC 2009 DOI 10.1007/978-1-59745-251-9_5 Chapter 5 str 93-112
- Rambaut A., Drummond A.J. 2009. Tracer v1.5, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Rannala B., Yang Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, 43: 304–311
- Rull, V. 2009. Microrefugia. *Journal of Biogeography*, 36: 481 – 484
- Schwarz G. 1978. Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics*, 6: 461-464
- Sideleva. V.G., 1994. Speciation of endemic Cottoidei in Lake Baikal. V: Speciation in Ancient Lakes. Martens, K., Goddeeris B., Coulter G., (Ur.), Stuttgart, Arch. Hydrobiol. Beih. Ergbn. Limnol., 44: 441-450
- Sonnenberg R., Nolte A., Tautz D., 2007. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Frontiers in Zoology* 2007, 4:6
- Stewart J. R. , Lister A.M., Barnes I., Dalen L. 2009. Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time, *Proceedings of the Royal Society*, 277: 661-671

- Šediva A, Janko K, Šlechtova V, 2008. Around or across the Carpathians: colonization model of the Danube basin inferred from genetic diversification of stone loach (*Barbatula barbatula*) populations. *Molecular Ecology*; 17: 1277-1292
- Šlechtova V., Bohlen J., Freyhof J., Persat H., Delmastro G.B., 2004. The Alps as a barrier to dispersal in cold-adapted freshwater fishes? Phylogeographic history and taxonomic status of the bullhead in the Adriatic freshwater drainage. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33, 1: 225-239
- 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, 3: 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* doi:10.1093/molbev/msr121.
- Toews D., Brelsford A. 2012 The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*, 21, 16: 3907-3930
- Trincardi F., Correggiari A., 1998. Quaternary forced regression deposits in Adriatic basin and the record of composite sea-level cycles. *Iz knjige Sedimentary responses to forced regressions. Geological society, London, Special publications*, 172: 245-269.
- Trontelj P., Machino Y., Sket B. 2004. Phylogenetic and phlogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34: 212-226
- Uiblein F., Jagsch A., Honsig-Erlenburg W., Weiss S. 2001. Status, habitat use and vulnerability of the European grayling in Austrian waters. *Journal of Fish Biology*, 59, A: 223-247
- Volckaert F.A.M., Hanfling B., Hellems B., Carvalho G.R., 2002. Timing of the populations dynamics of bullhead *Cottus gobio* (Teleostei: Cottidae) during the Pleistocene. *Journal of Evolutionary Biology*, 15: 930-944
- Vonlanthen P., Excoffier L. Bittner D., Persat H., Neuenschwander S., Largiander C.R. 2007. Genetic analysis of potential postglacial watershed crossings in Central Europe by the bullhead (*Cottus gobio* L.). *Molecular Ecology*, 21: 4572-4584

- Weiss S., Persat H., Eppe R., Schlotterer C., Uiblein F. 2002. Complex patterns of colonization and refugia revealed for European grayling *Thymallus thymallus*, based on complete sequencing of the mitochondrial DNA control region. *Molecular Ecology*, 11: 1393-1407
- Xia X., Lemey P. 2009. Assessing substitution saturation with DAMBE. Pp 615-630 in Philippe Lemey, Marco Salemi and Anne-Mieke Vandamme, eds. *The Phylogenetic Handbook: A practical approach to DNA and Protein phylogeny*. 2nd edition Cambridge University Press
- Yokoyama R., Goto A., 2005. Evolutionary history of freshwater scuplins, genus *Cottus* (Teleostei; Cottidae) and related taxa, as inferred from mitochondrial DNA phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 36: 654-668
- Yule G.U. 1924. A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. J.C. Willis, F.R.S. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B* 213, 21–87