

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Teo Delić

**VPLIV POLEDENITVE NA FILOGEOGRAFSKO STRUKTURO
SLEPE POSTRANICE *Niphargus stygius***

Diplomsko delo
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF PLEISTOCENE GLACIATION ON THE
PHYLOGEOGRAPHIC STRUCTURE OF THE AMPHIPOD *Niphargus
stygius***

Graduation Thesis
University Studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za zoologijo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomske naloge imenovala doc. dr. Ceneta Fišerja in za somentorico dr. Valerijo Zakšek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: izr. prof. dr. Boris Bulog

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: izr. prof. dr. Peter Trontelj, recenzent

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član doc. dr. Cene Fišer, mentor

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: dr. Valerija Zakšek, somentor

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 12. 9. 2012

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela

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

Teo Delić

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dn

DK 591.5:551(043.2)=163.6

KG *Niphargus stygius*/ pleistocen/ filogeografija/ koalescenca/ znotrajvrstna raznolikost

AV DELIĆ, Teo

SA FIŠER Cene (mentor) / ZAKŠEK Valerija (somentor)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2012

IN VPLIV POLEDENITVE NA FILOGEOGRAFSKO STRUKTURO SLEPE
POSTRANICE *Niphargus stygius*

TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)

OP X, 44 str., 1 pregl., 12 sl., 5 pril., 103 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Pleistocenske poledenitve so močno vplivale na razširjenost podzemeljske favne. Zadnji poledenitveni vrhunec (pred 21.000 let) je povzročil izumrtje domnevne predpleistocenske podzemeljske favne v Severni Evropi in Alpah, le malo vrst je uspelo preživeti v refugijih brez ledu. Novejša literatura navaja vsaj štiri vrste stigobiontskih postranic, ki so preživele zgornji pleistocen pod ledenim pokrovom. Območje razširjenosti vrste *Niphargus stygius* (Schiödte, 1847) je v zahodni Sloveniji in skrajnjem vzhodu Italije, v višinskem pasu do 1.600 m.n.v. Vključuje tako nekdanj poledenela kot tudi nepoledenela območja. Cilj naloge je bil testirati dva možna evolucijska scenarija: (I) predniške populacije s poledenelih območij so izumrle v času pleistocenskih poledenitev, današnje populacije na tem področju so posledica po-ledenodobne kolonizacije; (II) nekatere populacije so preživele pod ledom. Analizirali smo 125 osebkov s 47 različnih lokacij (jame, izviri in drugo) z dvema mitohondrijskima (COI in 16S rRNA) in enim jedrnim (ITS) markerjem. Ugotavljali smo filogenetske odnose za vsakega od markerjev posebej in njihovo združeno zaporedje s pomočjo Bayesovega pristopa. Analiza združenega zaporedja je pokazala obstoj treh filogenetskih skupin: Jugoahodne, Centralne in Alpske. Odnosi dobljeni na podlagi Mitohondrijske in jedrne DNA se medsebojno ne ujemajo. Haplotipi, prisotni na območju nekdanjega ledenika, se drugod ne pojavljajo. Na temelju rezultatov sklepamo, da so vsaj nekatere populacije Alpske skupine preživele pod pleistocenskim ledenikom.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND Dn

DC 591.5:551(043.2)=163.6

CX *Niphargus stygius*/ Pleistocene/ phylogeography/ koalescence/ intraspecific diversity

AU DELIĆ, Teo

AA FIŠER Cene (supervisor) / ZAKŠEK Valerija (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

PY 2012

TI THE EFFECT OF PLEISTOCENE GLACIATION ON PHYLOGEOGRAPHIC
STRUCTURE OF AN AMPHIPOD *Niphargus stygius*

DT Graduation Thesis (University studies)

NO X, 44 str., 1 tab., 12 fig., 5 ann., 103 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Pleistocene glaciations had a major impact on the distribution of subterranean fauna. The Last Glacial Maximum (21,000 years ago) presumably caused mass extinctions of subterranean fauna in Northern Europe and Alps, leaving few species which survived mainly in ice-free refugia. Some recent publications, however, provide evidence that at least four stygobiotic amphipod species survived Upper Pleistocene events under glacial cover. *Niphargus stygius* (Schiödte, 1847) is distributed in western Slovenia and in the easternmost karstic areas of Italy, from the sea level and up to 1,600 m.s.l.; its range includes both, formerly glaciated and ice-free areas. The aim of our study was to test two possible evolutionary scenarios for *Niphargus stygius*: (I) the ancient populations inhabiting glaciated area became extinct during Pleistocene glaciations and present-day populations in this area are a result of post-glacial colonization; (II) some populations survived under glacier cover. We analyzed 125 specimens from 47 different localities (caves, springs, ect.) using two mitochondrial (COI and 16S rRNA) and one nuclear (ITS) markers. We reconstructed the phylogeny from each marker separately and all markers combined using two different Bayesian methods. Analysis of combined data sets identified three well supported lineages: Southwestern, Central and Alpine lineage, while mtDNA and nucDNA gene datasets gave incongruent population trees. Haplotypes present in the area covered by the ice sheet during the maximum extent of Quaternary glaciations are absent elsewhere within the species range, suggesting that at least some populations of the Alpine lineage survived underneath the glacier cover.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
1 UVOD	I
1.1 PREGLED OBJAV	2
1.1.1 Rod <i>Niphargus</i>	2
1.1.2 Taksonomska problematika kriptičnih vrst	3
1.1.3 Zgodovina vrste <i>Niphargus stygius</i> in njena taksonomska problematika	3
1.1.4 Pleistocenske poledenitve v Sloveniji	6
1.1.5 Vpliv pleistocenskih poledenitev na jamsko favno	8
1.1.6 Filogeografija in koalescenčna teorija	9
2 MATERIALI IN METODE	11
2.1 MATERIALI	11
2.2 METODE	12
2.2.1 Izolacija DNA	12
2.2.2 Pomnoževanje DNA v verižni reakciji s polimerazo (PCR)	12
2.2.3 Čiščenje vzorcev	14
2.2.4 Določanje in analiza nukleotidnih zaporedij	14
2.2.5 Filogenetske analize	15
2.2.6 Krivulja kopičenja haplotipov	17
3 REZULTATI	18
3.1 GENETSKA VARIABILNOST IN KRIVULJE KOPIČENJA HAPLOTIPOV	18
3.2 FILOGENETSKA DREVESA	19
3.2.1 Analize 35 osebkov in predhodna filogeografska analiza	20
3.2.2 Analize z več osebki in mreža haplotipov	26
4 RAZPRAVA	29
4.1 FILOGENETSKA STRUKTURA IN PREŽIVETJE POD LEDOM	29

4.2 VPLIV POVEČANEGA ŠTEVILA PRIMERKOV ALI GENOV	31
5 SKLEPI	34
6 POVZETEK	35
7 VIRI	37
7.1 CITIRANI VIRI	37
7.2. DRUGI VIRI	44
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: Prikaz analiziranih osebkov, dolžine odsekov analiziranih genov, variabilnosti ter števila haplotipov ali različnih jedrnih zaporedij za podskupino 35 osebkov oz. vseh analiziranih osebkov, vrednost v oklepaju.....	18
---	----

KAZALO SLIK

Slika 1: Skica samca <i>N. stygius</i> z označenimi znaki, si so pomembne za morfološko prepoznavo vrste: a) razmerje velikosti kopitastega člana I in II gnatopoda, b) razmerje velikosti ramusov uropoda I, c) podaljšan distalni člen uropoda III (samo pri samcih), d) telzon z apikalnimi in lateralnimi trni. Nad skico habitusa so povečane strukture a, b in d, za katere merilo ne velja (Vir skice habitusa: Fišer 2012).....	5
Slika 2: Povprečne letne temperature zraka v Sloveniji, v obdobju 1971-2000 (Agencija RS za okolje 2006).....	6
Slika 3: Obseg ledenikov v Sloveniji v času spodnjega in srednjega pleistocena ter zadnjega poledenitvenega vrhunca LGM).....	7
Slika 4: Razširjenost vrste <i>Niphargus stygius</i> , kjer so označene vsa znana najdišča iz Podatkovne zbirke SubBioDatabase.....	11
Slika 5: Krivulje kopičenja haplotipov/jedrnih zaporedij za: a) 125 osebkov COI gena, b) 41 osebkov 16S rRNA in, c) 42 osebkov ITS gena. Os x prikazuje število povzorčenih lokacij, os y število haplotipov. Polna linija prikazuje potek izračunane krivulje, prekinjena linija pa 95 % interval zaupanja.....	19
Slika 6: Drevo mitohondrijskih COI zaporedij <i>Niphargus stygius</i> po izračunano Bayesovi metodi s programi *BEAST (levo) in MrBayes (desno). Prikazane so posteriorne verjetnosti posameznih cepitev. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po GTR+G+I modelu substitucij.....	21
Slika 7: Drevo mitohondrijskih 16S rRNA zaporedij <i>Niphargus stygius</i> izračunano po Bayesovi metodi s programi *BEAST (levo) in MrBayes (desno). Prikazane so posteriorne verjetnosti posameznih cepitev. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po GTR+G modelu substitucij.....	22
Slika 8: Drevo jedrnih ITS zaporedij <i>Niphargus stygius</i> izračunano po Bayesovi metodi s programi *BEAST (levo) in MrBayes (desno). Prikazane so posteriorne verjetnosti posameznih cepitev. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po GTR+G+I modelu substitucij.....	23
Slika 9: Drevo združenih ITS, 16S rRNA in COI zaporedij <i>Niphargus stygius</i> izračunano po Bayesovi metodi s programi *BEAST (levo) in MrBayes (desno). Prikazane so posteriorne verjetnosti posameznih cepitev. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po GTR+G+I modelu substitucij.....	24
Slika 10: Razširjenost okvirnih filogeografskih skupin slepe postranice <i>N. stygius</i> kot rezultat filogenetskih dreves izračunanih po metodi *BEAST na podskupini 35 vzorcev a) gena za COI, b) gena za 16S rRNA, c) gena za ITS in d) združenih zaporedij treh genov.....	25
Slika 11: Drevo mitohondrijskega COI gena (125 osebkov) <i>Niphargus stygius</i> izračunano po Bayesovi metodi s programom *BEAST (levo) in MrBayes (desno). Filogenetske skupine so povečane zunaj okvira. Prikazane so posteriorne verjetnosti posameznih cepitev. Dolžine vej so sorazmerne genetskimi razdaljami po GTR+G+I modelu substitucij.....	27
Slika 12: Mrežna analiza haplotipov po metodi »median-joining«. Velikost kroga je sorazmerna frekvenci določenega haplotipa. Črne pike predstavljajo manjkajoče ali nepovzorčene haplotipe. Povdarjeni so haplotipi iz območja pleistocenskih ledenikov.....	28

KAZALO PRILOG

PRILOGA A.....Drevo mitohondrijskih 16S rRNA zaporedij *Niphargus stygius* po Bayesovi metodi s programi *BEAST (levo) in MrBayes (desno). Prikazane so posteriorne verjetnosti posameznih cepitev. Dolžine vej so sorazmerne genetskimi razdaljami po GTR+G modelu substitucij

PRILOGA B.....Drevo mitohondrijskih ITS zaporedij *Niphargus stygius* po Bayesovi metodi s programi *BEAST (levo) in MrBayes (desno). Prikazane so posteriorne verjetnosti posameznih cepitev. Dolžine vej so sorazmerne genetskimi razdaljami po GTR+G+I modelu substitucij

PRILOGA C.....Razširjenost filogeografskih skupin *N. stygius* na podlagi filogenetskih dreves izračunanih s programom BEAST na polnem obsegu a) gena za COI, b) gena za 16S rRNA, c) gena za ITS.

PRILOGA D.....Preglednica: Seznam lokalitet molekulsko analiziranih osebkov *Niphargus stygius* sensu lato. Koordinate (X,Y) so podane v Gauss – Kruegerjevem geografskem sistemu. COI, 16s rRNA in ITS označujejo analizirano nukleotidno zaporedje. Znak + pomeni, da je določeno nukleotidno zaporedje bilo vključeno v naše filogenetske analize. Če ni oznake za haplotip, pomeni da analiza ni bila uspešna.

PRILOGA E.....Preglednica: 28 testiranih oligonukleotidnih začetnikov. Povdarjeni so tisti, vključeni v nadaljne analize.

1 UVOD

Pomemben delež sladkovodne favne v podzemeljskih habitatih predstavljajo postranice (Amphipoda). Znanih je 1870 sladkovodnih vrst in podvrst postranic, od teh približno 45 % vrst poseljuje podzemeljske habitate. Centri vrstne pestrosti postranic so v kraških območjih Srednje in Južne Evrope (Niphargidae), Severne Amerike (Crangonyctidae) in Avstralije (Paramelitidae) (Väinölä in sod. 2008). Visoki vrstni pestrosti postranic pomembno prispeva fragmentiranost podzemeljskih habitatov, odsotnost disperzijskih stadijev (npr. plankotnske ličinke) in domnevna ekološka stenekost jamskih vrst. Prav zaradi stenekosti podzemeljskih vrst naj bi ledeniki močno vplivali na njihovo prostorsko razporeditev (Folquier in sod. 2008; Stoch in Galassi 2010).

Slepe postranice iz rodu *Niphargus* pomembno prispevajo k biotski raznovrstnosti podzemeljskih voda (Sket 1999a, 1999b). Več kot 300 vrst iz rodu poseljuje vse tipe podzemeljskih voda evropske celine, z izjemo Pirinejskega polotoka. Večina vrst živi južno od meja pleistocenskih ledenikov (Proudlove in sod. 2003).

Prepoznava taksonov na podlagi zunanjih morfoloških znakov se je zaradi variabilnosti znakov pri rodu *Niphargus* izkazala za težavno (Léfebure in sod. 2006a, 2006b, 2007; Trontelj in sod. 2009), kar velja tudi v primeru vrste *Niphargus stygius*.

Razširjenost vrste *Niphargus stygius* (Schiödte 1849) v več ozirih nenavadna. Območje razširjenosti se razteza: (1) preko dveh biogeografskih regij; (2) preko črnomskega in jadranskega povodja; (3) od gladine morja do 1600 m nadmorske višine, torej v območju celoletnih povprečnih temperatur med 12 °C in 0 °C (ARSO, 2012). (4) Območje razširjenosti vrste obsega tudi območje nekdanjega alpskega ledenika.

Ob tem se postavi vprašanje ali gre v primeru *N. stygius* za neobičajno, ekološko evrivalento vrsto z dobrimi migracijskimi sposobnostmi, ali kompleks dveh ali več kriptičnih vrst? Zato smo v nalogi skušali:

- Raziskati filogenetske in filogeografske odnose med populacijami *N. stygius* s celotnega območja razširjenosti na podlagi analize nukleotidnega zaporedja različnih genskih odsekov (mitohondrijskih genov za 16S rRNA in COI ter jedrnega gena za ITS);

- ugotoviti ali je nominalna vrsta *Niphargus stygius* samostojna vrsta, ali gre za skupino kriptičnih vrst;
- ugotoviti genetsko strukturiranost populacij;
- ugotoviti dejavnike, ki bi lahko vplivali na filogeografsko strukturo skupine *N. stygius*.

1.1 PREGLED OBJAV

1.1.1 Rod *Niphargus*

Podzemeljske vode so zaradi popolne teme, nizke koncentracije kisika (O₂) ter skopih in nepredvidljivih virov hrane ekstremen habitat (Malard & Hervant 1999; Hüppop 2000). Kljub ekstremnim razmeram v podzemeljskih vodah je 25 let nazaj opisanih bilo več kot 7000 stigobiontov (Botosaneanu 1986). Z več kot 300 opisanimi vrstami je rod slepih postranic *Niphargus* Schiödte 1847 (Amphipoda: Niphargidae) največji rod sladkovodnih postranic (Karaman in Ruffo 1986; Väinölä in sod. 2008). Starost rodu so na podlagi treh fosilnih osebkov ocenili vsaj na 30-50 milijonov let (Jazdzewski in Kupryjanowitz 2010). Večji del vrst so prebivalci podzemeljskih voda, ki predstavljajo pomemben delež biotske pestrosti evropskih podzemeljskih vod (Sket 1999a). Pripadniki rodu so slepe in depigmentirane živali; od tod tudi rodovno ime (grška beseda niphargês – snežno bel) (Flot in sod. 2010). Poseljujejo Evropo, večinoma južno od meje pleistocenskih poledenitev, z izjemo Pirenejskega polotoka (Karaman in Ruffo 1986; Proudlove in sod. 2003); nekaj vrst je znanih z Arabskega polotoka, Turčije in Irana (Bat in sod. 2001; Karaman 1986; Karaman 1998). Nekaj novejših študij navaja podatke o vrstah postranic iz različnih družin, ki so pleistocen preživele pod ledenikom ali celo severno od meje ledeniškega pokrova (Häfling s sod. 2009; Léfébure in sod. 2007).

Slepe postranice naseljujejo vse tipe podzemeljskih voda: freatične, intersticielne, jamske tokove, jezerca, sisteme špranj v epikrasu, izvire, somorne, mineralne in termalne vode. Poleg naštetega obstaja še kopica vrst, ki poseljujejo površinske vode. V primerjavi s površinskimi raki so pripadniki rodu *Niphargus* tolerantnejši na skrajne vrednosti fizikalnih in kemijskih parametrov vode (Fišer 2012). Bolje prenašajo stradanje kot njihovi daljni površinski sorodniki iz rodu *Gammarus*; ob stradanju doživijo manjši fiziološki stres (Mezek in sod. 2009) in si lahko tudi po dolgotrajnem (200 dni) stradanju povsem opomorejo (Hüppop 2000).

1.1.2 Taksonomska problematika kriptičnih vrst

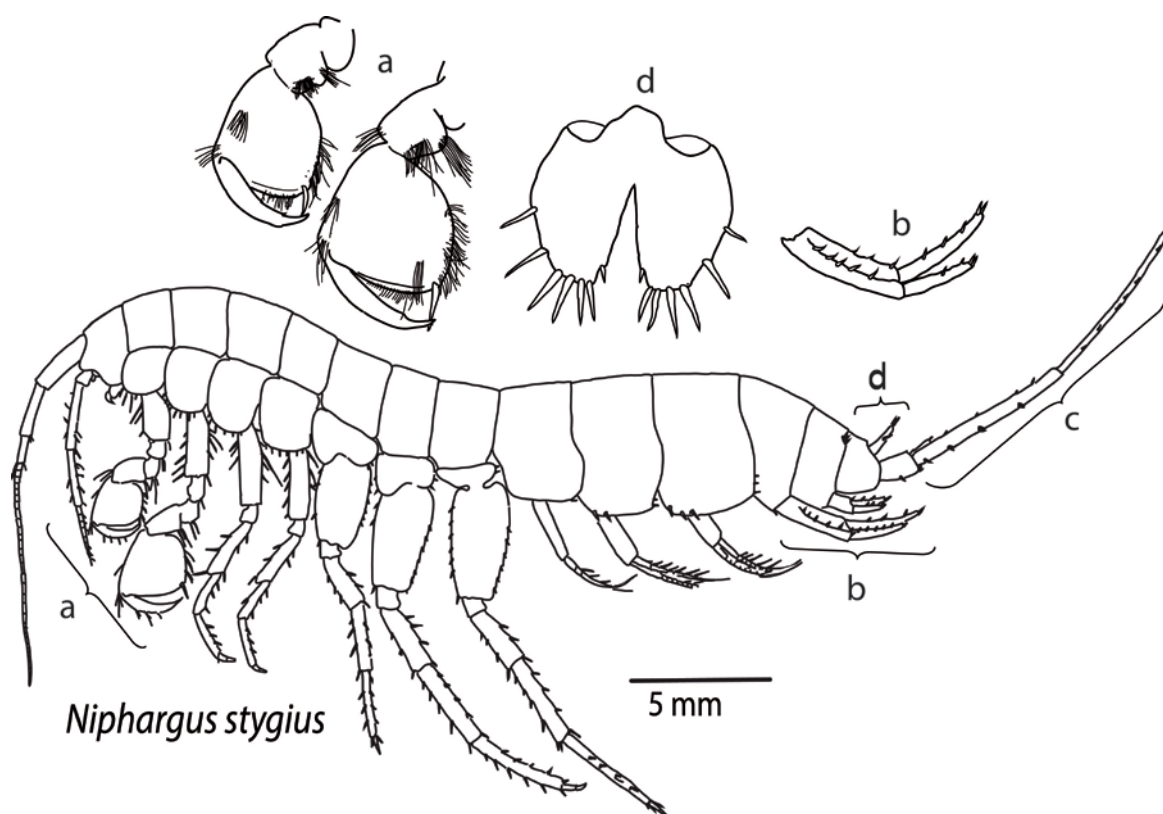
Večina vrst postranic, vključno s površinskimi, je endemitov z ozko razširjenostjo. Tradicionalna taksonomija rakov (Crustacea), temelječa na morfoloških značilnostih, dolgo časa ni obvladala problema kriptičnih vrst. V grobem lahko kriptične vrste opredelimo kot dve ali več vrst, ki jih zaradi morfološke enotnosti obravnavamo kot eno nominalno vrsto (Bickford in sod. 2007). Kriptične vrste so znane pri različnih skupinah rakov, med njimi tudi pri sladkovodnih postranicah (Hogg in sod. 2006; Müller 2000; Witt in Hebert 2000). Filogenetske in filogeografske raziskave kažejo na veliko večje razlike na molekularni kot na morfološki ravni med sestrskimi vrstami znotraj rodu *Niphargus*, kot tudi drugih skupin stigobiontov (Léfebure in sod. 2006a; Léfebure in sod. 2007; Trontelj in sod. 2009). Tudi pri nekaterih formalno priznanih in morfološko homogenih vrstah, za katere je do nedavna držalo, da imajo velika območja razširjenosti (*N. aquilex* Schiödte, *N. longicaudatus* Costa, *N. rhenorhodarensis* Schellenberg, *N. tatrensis* Wrzesniowky, *N. tauri* Schellenberg, *N. virei* Chevreux itd.) so molekularne analize pokazale, da gre za komplekse vrst. Znotraj rodu slepih postranic je 49 % vrst, ki so znane samo s tipske lokalitete; le 18 % jih je takih, ki imajo območje razširjenosti večje od 200 kilometrov (Trontelj in sod. 2009). Za 14 vrst, ki so jih obravnavali kot nominalne vrste, z območjem razširjenosti večjim od 200 kilometrov, se je iskazalo, da so sestavljene iz morfološko enotnih vrst (Trontelj in sod. 2009). Tudi med vrstami s precej manjšimi območji razširjenosti poznamo primere, kjer se za enotnim imenom krije več vrst. Tak primer je istrska slepa postranica *N. krameri*, z najdaljšo diagonalo območja razširjenosti 70 km, pri kateri je bil z morfološkimi opazovanji nakazan (Fišer in sod. 2006) in z molekularno analizo potrjen obstaj dveh kriptičnih vrst (Fišer 2011; Trontelj in sod. 2009). Podobne primere poznamo iz Romunije, t.j. kompleksa vrst *N. bihorensis* in *N. laticaudatus* (Fišer C., osebni vir). Razloge za nastanek številnih kriptičnih vrst znotraj rodu *Niphargus* lahko iščemo v diferenciaciji sestrskih alopatričnih linij, ali konvergentni in paralelni evoluciji ne-sestrskih linij (Trontelj in sod. 2009).

1.1.3 Zgodovina vrste *Niphargus stygius* in njena taksonomska problematika

Vrsto *Niphargus stygius* je poimenoval Schiödte, potem ko je leta 1849 pregledoval lasten, dve leti star, opis vrste *Gammarus stygius*. Takrat je zasnoval nov rod (Karaman 1952;

Sket 1974), in *N. stygius* je postal nominalna vrsta danes največjega rodu sladkovodnih postranic, slepih postranic rodu *Niphargus*. Kljub dejstvu, da se je opis vrste nanašal na osebkne nabrane v Predjamskem sistemu (Jama za gradom, Predjama) in v Postojnski jami (Adelsberger-hulen), so poznejši avtorji kot tipsko lokaliteto pogosto navajali le bolj znano Postojnsko jamo (Karaman 1952; Sket 1974). Pridevnik vrstnega imena je izpeljanka iz grške besede Styx, ki označuje mitsko reko sovraštva na vhodu v podzemni svet Had (Schmidt 2001). Opis vrste je leta 1933 ponovil Schellenberg, leta 1942 pa še d' Ancona (Karaman 1952). Poleg naštetih avtorjev so se z *N. stygius* *sensu lato* ukvarjali še M. Straškraba (1972), G. Karaman (1993), F. Stoch (1998), in drugi. Stanko Karaman je zaradi napake, ki jo je v opisu vrste zagrešil Schellenberg, vrsto ponovno opisal, in sicer na osnovi osebkov iz Postojnske jame. Poleg opisa *Niphargus stygius stygius* Schiödte 1847, je ustanovil podrod *Stygoniphargus* v katerega je vključil še druge, za takratno znanost nove predstavnike podrodu: *Niphargus s. s. f. valvasori n.f.*; *Niphargus s. podpecanus n. ssp.*; *Niphargus s. likanus n. ssp.*; *Niphargus s. novomestanus n.ssp.*; *Niphargus s. brachytelson n. ssp.*; *Niphargus s. karamani* Schellenberg 1935; *Niphargus s. kenki n. ssp.* (Karaman 1952). Prve molekulske študije so pokazale, da opisane podvrste pripadajo vsaj trem ločenim filogenetskim linijam (Fišer in sod. 2008). Nominotipski vrsti je sorodna le *N. s.s. f. valvasori*. Vse opisane taksoni, razen forme *Niphargus s. s. f. valvasori*, ki je ostala znotraj *N. stygius*, so kasneje povzdignili na nivo samostojnih vrst (Fišer in sod. 2008).

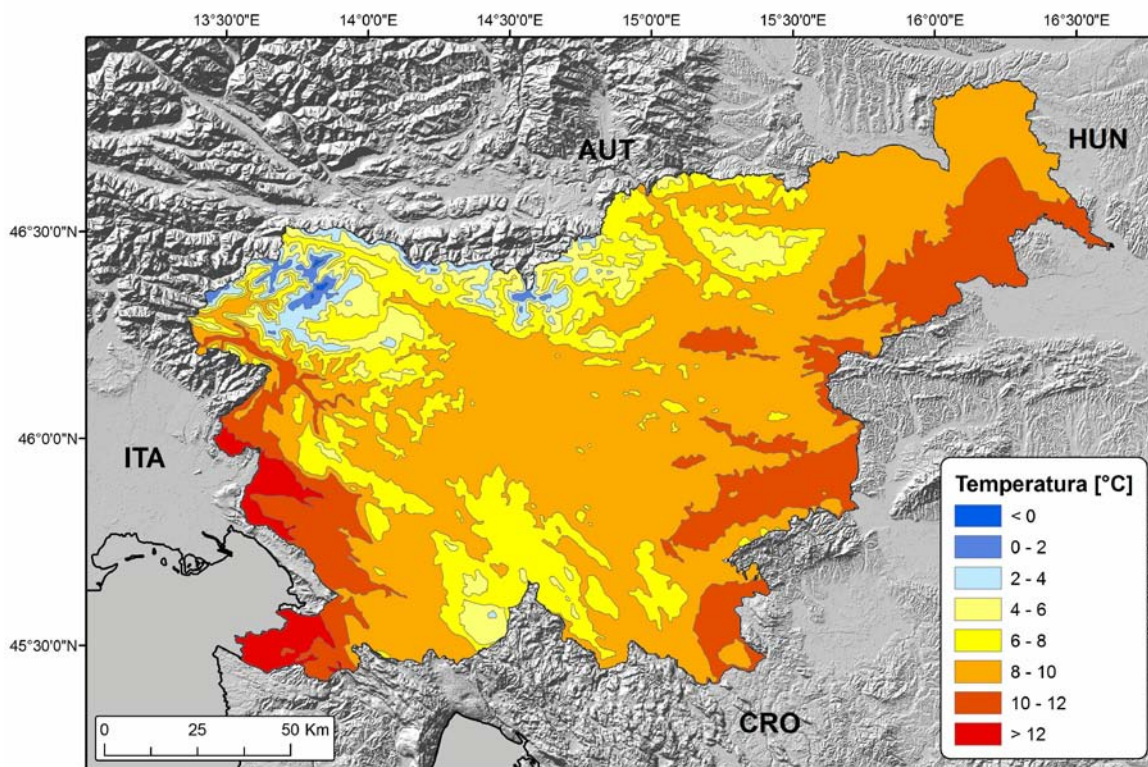
Telo je podolgovato, pri samcih neredko daljše od 25 mm, pri samicah do 20 mm. Od drugih pripadnikov rodu, prisotnih na območju razširjenosti vrste, se *N. stygius* razlikuje po naslednjih znakih: (a) gnatopoda I-II s kroglastim 6 členom, pri gnatopodu II izrazito večji kot pri gnatopodu I, prednja stran 5 člena le z distalnim šopom ščetin; (b) veje uropoda I se med spoloma ne razlikujejo, notranja veja največ za 15% daljša od zunanje; izjemoma smo na idrijskem našli le maloštevilne samce s podaljšano notranjo vejo; (c) uropod III je pri samcih močno podaljšan na račun distalnega člena eksopodita; (d) telzon vedno z apikalnimi in lateralnimi trni, občasno tudi z mezialnimi, dorzalnih trnov ni (Slika 1).



Slika 1: Skica samca *N. stygius* z označenimi znaki, si so pomembne za morfološko prepoznavo vrste: a) razmerje velikosti kopitastega člena I in II gnatopoda, b) razmerje velikosti ramusov uropoda I, c) podaljšan distalni člen uropoda III (samo pri samcih), d) telzon z apikalnimi in lateralnimi trni. Nad skico habitusa so povečane strukture a, b in d, za katere merilo ne velja (Vir skice habitusa: Fišer 2012).

Slepa postranica *N. stygius* je razširjena preko dinarskega in alpskega biogeografskega območja (Slika 4). Naseljuje področje med Mangartom kot najbolj severnim, Tržičem kot najbolj zahodnim, Podgrajskim podoljem kot najbolj južnim in vzhodnim delom Cerkniškega polja, kot najbolj vzhodnim nahajališčem (Slika 4). Velja za prebivalca jamskih lužic v glini, kamor pride s kapljanjem prenikle vode skozi špranje epikrasa (Sket 1974). Osebki zakopani v jamskem blatu preživijo daljša sušna obdobja ter so prilagojeni na življenje v vodnem okolju s temperaturami med 9 °C v južnem in 0 °C na severnem delu areala razširjenosti (Sket 1974) (Slika 2). O trdoživosti vrste priča tudi najdba živih osebkov v prenikli vodi s 14 ‰ slanostjo, kot posledico posipanja avtocestnega voziča s soljo proti zmrzovanju, v jami Logarček pri Lazah (lastna opažanja). Je pogost prebivalec tekočih voda v izvirskih ali ponornih jamah, npr. Jama pod Smoganico; Čendova jama; Ciganska jama pri Predgrižah; Bele vode; Medjame in Zelške jame (vse lastna opažanja). Vodni tok osebke nanese tudi na mesta kjer se podzemeljska voda pojavlja na površju v obliki kraških izvirov (Sket 1974). Izviri pa vrsti najverjetneje ne ustrezajo najbolj;

fiziološke meritve (Simčič in Brancelj 2007) in vedenjska opazovanja kažejo, da vrsta že ob nizkih svetlobnih jakostih doživi fiziološki stres (Cene Fišer, osebna komunikacija)



Slika 2: Povprečne letne temperature zraka v Sloveniji, v obdobju 1971-2000 (Agencija RS za okolje 2006).

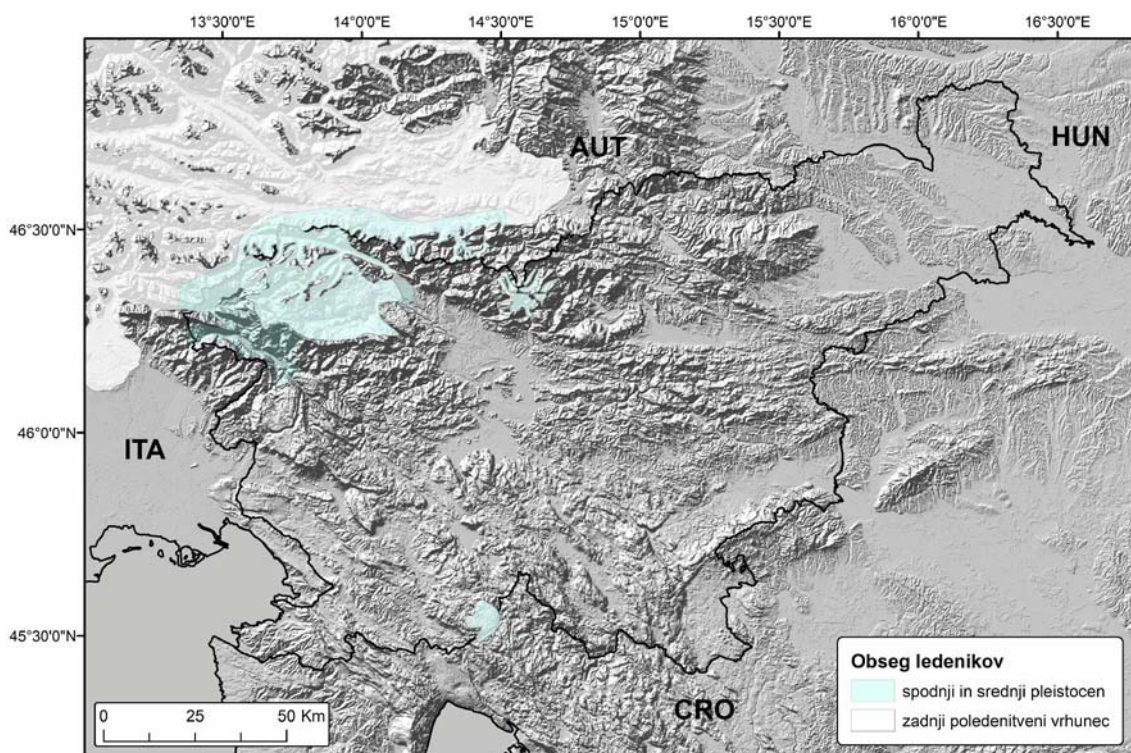
1.1.4 Pleistocenske poledenitve v Sloveniji

Osrednji deli Julijskih Alp, Kamniško-Savinjskih Alp in Karavank so bili v pleistocenu (2.600.000 – 11.700 let nazaj) večkrat pod ledenim pokrovom. Močan vpliv ledeniških jeder se je čutil tudi v ledeniških in rečnih dolinah, skozi katere so se ledeniki premikali in iztekali (Bavec in sod. 2004).

Zaradi maloštevilnih sedimentnih podatkov o ledenih dobah spodnjega in srednjega pleistocena v Sloveniji je vprašanje velikosti ter obsega Bohinjskega in Soškega ledenika v teh obdobjih še vedno predmet razprave.

Ledeniški pokrov Julijskih Alp se je v pleistocenu, zahodno od razvodnice, nabiral v Soški ledenik, ki se je potem iztekal v Jadransko morje. Zgornji pleistocen se je začel v interglacialu med poledenitvami Riss in Würm, pred približno 126 000 leti (Bavec 2007). Glacialni sedimenti iz tega obdobja obstajajo predvsem v višjih, gorskih legah, nekaj

erozijskih ostankov najdemo tudi v alpskih dolinah, kjer so vidni kot ostanki terminalnih moren. Zgodnji avtorji (Kunaver 1975; Kuščer in sod. 1974) navajajo, da je Soški ledenik tako v spodnjem, kot srednjem pleistocenu dosegal Tolmin in Most na Soči (Bavec in Verbič 2011). To tezo so s preučevanjem lastnosti sedimentov in računalniškimi modeli ledenikov ovrgli. Danes menijo, da Soški ledenik po dolinah Soče in Koritnice ni segal dlje od Bovca (Bavec in sod. 2004).



Slika 3: Obseg ledenikov v Sloveniji v času spodnjega in srednjega pleistocena ter zadnjega poledenitvenega vrhunca (LGM).

Ledeni pokrov Karavank in Julijskih Alp je vzhodno od Jadransko-Črnomske razvodnice, preko sistema manjših dolin, »hranil« ledenika v dolinah Bohinja in Save Dolinke. Vz dolž današnjih rečnih dolin Save Bohinjke in Save Dolinke, se je ledenik raztezal vse do Radovljice (Šifrer 1992). Bohinjski ledenik je v zgornjem pleistocenu delno prekrival Pokljuško planoto in z več kot 900 metrov debelo plastjo ledu je bil največji ledenik pri nas (Bavec in Verbič 2011). Meja Bohinjskega ledenika je segala vse do Radovljice in Bleda, kjer so vidne končne morene štirih ledenih dob (Žlebnik 1971): Günz

(pred 680-620.000 let nazaj); Mindel (455-380/300 000 let nazaj); Riss (pred 200-130 000 let nazaj) in Würm (pred 126 000-11 700 let nazaj).

V Kamniško-Savinjskih Alpah je Jezerski ledenik po dolini Kokre segal do Fužine (Buser 1980), ledenik v Kamniški Bistrici pa je dosegal sotočje Kamniške Bistrice in Korošice (Šifrer 1961). Poleg naštetih alpskih ledenikov, je v času zgornjega pleistocena obstajal še Snežniški ledenik. Končne morene edinega dinarskega ledenika pri nas so se na svojem višku spustile do 900 m.n.v. (Slika 3) (Šikić in Pleničar 1975)

1.1.5 Vpliv pleistocenskih poledenitev na jamsko favno

Na severni polobli je na razširjenost vrst vplival pleistocenski ledeni pokrov, ki ga je obkrožal permafrost in pomanjkanje tekoče vode (Hewitt 2004; Provan in Benett 2008; Williams in sod. 1998). Površinske vrste, nezmožne prilagoditve okoljskim spremembam, so večinoma izumrle. Tiste, ki so podzemeljske habitate uspešno naselile, predstavljajo t.i. reliktno favno (Danielopol in Rouch 2012). Številne živalske vrste podzemeljskih habitatov Evrope in Severne Amerike sodijo med favno, katere nastanek si razlagamo s t.i. modelom klimatskih reliktoev (Culver in Pipan 2009; Holsinger 2000; Danielopol in Rouch 2012). Število stigobiontov se zmanjšuje od južne meje ledu zadnjega poledenitvenega maksimuma (LGM) proti severnim zemljepisnim širinam (Gibert in Culver 2009; Proudlove in sod. 2003; Stoch in Galassi 2010).

Močan vpliv mraza in ledenikov na biodiverzitetu današnjih ledeniških potokov sta pokazala Jacobsen in Dangles (2011): nizke temperature domnevno zmanjšajo vrstno pestrost. Kljub temu, da so ledeniki osiromašili podzemeljsko favno, poznamo vsaj tri primere postranic iz različnih rodov, ki so poledenitev preživele v območju pleistocenskih ledenikov (Hänfling in sod. 2008; Léfébure in sod. 2007; Kornobis s sod. 2010). Prisotnost recentnih stigobiontov na nekdanjih poledenelih predelih razlagajo z več hipotezami: (I) ponovna naselitev zgodovinsko ledeniških območij iz refugijev vzdolž vodnih povezav hiporeika (Proudlove in sod. 2003); (II) obstoj populacij adaptiranih na nizke temperature v višjih legah brez ledu (nunatak) ali v tekoči vodi pod ledeniškim pokrovom (subglacialni refugiji) (Holsinger 1980).

Pleistocenski dogodki so močno vplivali na prostorsko na razporeditev vrst (Léfebure in sod. 2006; Léfebure in sod. 2007; Proudlove in sod. 2003, Stoch in Galassi 2010). Vrsta *Niphargus virei* se je izkazala kot zelo občutljiva na nizke temperature (Issartel in sod. 2005); pokazali so, da je na njeno razširjenost močno vplival alpski ledenik (Folquier in sod. 2008). Nasprotno poznamo vrste z istega območja, ki so poledenitev preživele v alpskih subglacialnih refugijih. Na razširjenost skupine kriptičnih vrst, *N. rhenorodanensis*, pleistocenski ledeniki niso vplivali tako drastično kot v primeru *N. virei*, saj rezultati filogeografskih raziskav kažejo, da so poledenitev preživeli pod ledom (Léfebure in sod. 2007). V prid hipotezi o preživetju v subglacialnih refugijih govorijo tudi eksperimentalni podatki; nekatere populacije *N. rhenorodanensis* so tolerantne na nizke temperature (Colson-Proch in sod. 2009).

1.1.6 Filogeografija in koalescenčna teorija

Filogeografija je relativno nova veja znanosti, ki proučuje prostorsko razporeditev genetskih linij, predvsem znotrajvrstnih in med vrstami v bližnjem sorodstvu (Avice 2000). Besedna zveza se je razvila 1987, približno deset let po začetnih poskusih ugotavljanja sorodstva pri organizmih na temelju mitohondrijske DNA (Avice 2009). Cenovna dostopnost in hiter tehnični napredek so omogočile vrtoglav razvoj znanosti v zadnjih desetletjih, filogenetske analize enega gena pa so prepustile mesto večlokusnim analizam.

Prve študije na večih genih, ki so bile narejene na različnih živalskih skupinah, so odkrile neujemanja med genskimi drevesi različnih genov (Degnan in Rosenberg 2009). Sprva so skušali rekonstruirati skupni vzorec s pomočjo t.i. konsenznih metod. Težava, ki pri tem nastane je ta, da algoritem največkrat ponavljajoči vzorec topologije dreves oceni za veljavno filogenetsko sosledje dogodkov. Po drugi strani združevanje različnih genov v skupni »supergen« zanemari razlike v evoluciji posameznih genov (Degnan in Rosenberg 2009). Ker različna genska drevesa pogosto vsebujejo različne vzorce razvejitev, se je razvila potreba po novi teoriji, ki bi z analizo različnih lokusov izdelala filogenetsko drevo, ki se čim bolj približa realnosti.

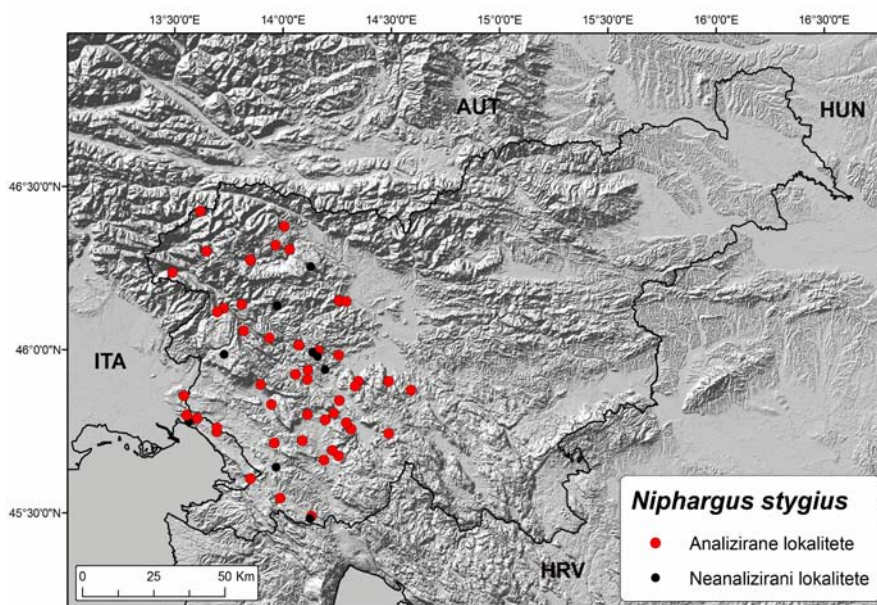
O koalescenčni teoriji so v osemdesetih neodvisno razmišljali številni avtorji. V današnji obliki jo je formuliral Kingman leta 1982 (Degnan in Rosenberg 2009; Rosenberg in Nordborg 2002). Teorija sloni na populacijsko genetskem modelu nevtralne evolucije, po

katerem vse genetske linije izvirajo iz skupnega prednika. Koalescenca je združitev linij v preteklosti. Koalescenca je v osnovi model izločanja linij, ki poteka nazaj v preteklost in omogoča vpogled v pretekle dogodke, ki vodijo vse do domnevnega skupnega prednika (Degnan in Rosenberg 2009). Vsakič, ko osebka iz različnih linij izbereta skupnega prednika, se ti dve združita v enotno linijo (koalescirata), saj so vse obstoječe kopije določenega mesta na genomu povezane s predniško varianto istega mesta. Tako se sčasoma vse linije združijo v enotni liniji – domnevnem skupnem predniku. Stopnja koalescence posameznih linij je odvisna od števila linij in velikosti populacije (Rosenberg in Nordborg 2002). Bolj ko so si analizirani organizmi ali geni podobni, krajši je čas koalescence in s tem tudi čas do skupnega prednika. Na čas koalescence vplivata zlasti velikost sedanje populacije in pretekli demografski dogodki.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 MATERIALI

V raziskavo smo vključili primerke slepe postranice *N. stygius* s celotnega območja njene znane razširjenosti: severozahodne, jugozahodne in osrednje Slovenije ter s skrajnega severovzhoda Italije (slika 4). V raziskavo smo vključili 172 primerkov s 55 lokacij, ki smo jih po zunanjih morfoloških značilnostih določili kot *N. stygius*. Pregled vseh analiziranih osebkov in opisi lokacij so zbrani v prilogi 7. V raziskavo smo vključili vzorce iz zbirke Katedre za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete (BF) Univerze v Ljubljani (UL) in vzorce, ki smo jih ciljno nabrali za namen te raziskave. Vzorci so shranjeni v 96 % etanolu, pri temperaturi – 20 °C, v zbirki Katedre za zoologijo. Za zunanjo skupino (outgroup) pri koreninjenju dreves smo uporabili nukleotidna zaporedja drugih vrst rodu *Niphargus*: *Niphargus rhenorodanensis* (Lefebure in sod. 2007) iz spletne baze GenBank in *Niphargus krameri* iz Zbirke podatkov o podzemeljski biodiverziteti Dinaridov z okolico ("SubBioDatabase"), Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.



Slika 4: Razširjenost vrste *Niphargus stygius*, kjer so označene vsa znana najdišča iz Podatkovne zbirke SubBioDatabase.

Figure 4: *Niphargus stygius* range; dots are representing known localities from the SubBioDatabase.

2.2 METODE

2.2.1 Izolacija DNA

Pri izbranem primerku smo s pomočjo igle in pincete odstranili enega izmed pereopodov in ga prenesli v označeno mikrocentrifugirko. To smo pustili odprto toliko časa, da je iz tkiva izhlapel preostali etanol. Preostanek živali smo spravili v ločeno mikrocentrifugirko. Genomsko DNA smo izolirali s kompletom »GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit« (Sigma, ZDA) po protokolu »Mammalian Tissue Preparation« in sledili navodilom opisanim v navodilih proizvajalca. Izolate genomske DNA smo shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

2.2.2 Pomnoževanje DNA v verižni reakciji s polimerazo (PCR)

V verižni reakciji s polimerazo smo pomnožili 1991 baznih parov (bp) dolg jedrni odsek ribosomske DNA (ITS), okrog 967 bp dolg odsek mitohondrijskega gena 16S rRNA in 592 bp dolg odsek mitohondrijskega gena za citokrom oksidazo I (COI). Uspešnost prileganja začetnih oligonukleotidov (angl. primer) in specifičnost pomnoževanja smo preverjali v 15 μl reakcijah. Da bi zagotovili zadostno količino PCR produkta za določanje nukleotidnega zaporedja, smo vse odseke pomnožili v 25 μl reakciji. DNA smo pomnožili v cikličnih termostatih »2720 Thermal Cycler« (Applied Biosystems, ZDA) in »Masterycler® ep« (Eppendorf, Nemčija).

Sestava 15 μl reakcije:

11,52 μl H₂O

1,5 μl 10x pufra PCR z dodanim MgCl₂ (Biotools, Španija)

1,5 μl 2 mM dNTP (Fermentas, Nemčija)

0,2 μl [20 mM] začetnega oligonukleotida a

0,2 μl [20 mM] začetnega oligonukleotida b

0,084 μl [5 U/ μl] Taq polimeraze (Biotools, Španija)

0,5 μl vzorčne DNA

V 25 μl reakciji so bila razmerja med reagenti enaka kot pri 15 μl reakcijah.

Začetna oligonukleotida za odsek jedrnega gena ITS (Flot in sod. 2010):

ITS F1 5' - TCCGAACTGGTGCCTTAGA - 3'
ITS R1 5' - TCCAAGCTCCATTGGCTTAT - 3'

Začetna oligonukleotida za odsek mitohondrijskega gena za COI (Simon in sod. 1994):

Jerry 5' - CAACATTTATTTTGATTTTTTGG - 3'
Maggie 5' - GGATAATCAGAATATGGTCGAGG - 3'

Začetna oligonukleotida za odsek mitohondrijskega gena za 16S rRNA (Lefébure in sod. 2006):

F - 77 5' - TAAGATTTAGTGTACAAATTGCCCGTC - 3'
R - 1000 5' - GGCTCAAGCCGATTTGAACTCAAATCATGT - 3'

Program PCR za pomnoževanje z začetnima oligonukleotidoma ITS F1 / ITS R1

94 °C	3 min	
94 °C	30 s	} 30x
54 °C	45 s	
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	

Program PCR za pomnoževanje z začetnima oligonukleotidoma Jerry / Maggie

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

Program za pomnoževanje z začetnima oligonukleotidoma 12S F1 / 16S R3

94 °C	3 min
-------	-------

94 °C	45 s	}	30x
54 °C	1 min		
72 °C	2 min		
72 °C	3 min		

Dolžine pomnoženih odsekov in njihovo količino smo preverili s horizontalno elektroforezo v 1 % agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom (EtBr), ki je tekla v 1 X tris acetatnem pufri (TAE). Dolžine DNA fragmentov smo ocenili s pomočjo velikostnega standarda »GeneRuler™ 100bp DNA« (Fermentas, Litva).

Poleg omenjanjih, smo dodatno testirali še 18 oligonukleotidnih začetnikov (Priloga E). V nadaljne analize jih nismo vključili zaradi neuspešnega poteka PCR ali prevelike konzerviranosti genskega odseka.

2.2.3 Čiščenje vzorcev

Produkte pomnožene v PCR smo očistili s pomočjo dveh encimov: eksonukleaze in temperaturno občutljive fosfataze. Eksonukleaza I razgrajuje enoverižno DNA v 3' => 5' smeri na koncu nukleotidnih verig z odstranjanjem nukleotidov, temperaturno občutljiva alkalna fosfataza pa katalizira sprostitvev 5' in 3' fosfatnih skupin z DNA, RNA in nukleotidov (Hames in Hooper 2006). V preostanek 25 µl PCR smo dodali 0,4 µl eksonukleaze (Exonuclease I) »Exo I, 20 u/µl, 20000 u« (Fermentas, Litva) ter 2 µl temperaturno občutljive alkalne fosfataze »FastAP™, 1u/µl, 1000 u« (Fermentas, Litva). Produkte PCR z dodanima encimoma smo inkubirali v cikličnem termostatu: 45 minut na 37 °C in 15 minut na 80 °C.

2.2.4 Določanje in analiza nukleotidnih zaporedij

Nukleotidna zaporedja očiščenih PCR produktov so določili v podjetju Macrogen (www.macrogen.com, Južna Koreja). Odseki COI in 16S rRNA genov so bili analizirani s pomočjo istih začetnih oligonukleotidov s katerimi smo jih že predhodno pomnožili. Za določitev nukleotidnega zaporedja odseku ITS gena smo zaradi njegove dolžine poleg začetnih oligonukleotidov uporabljenih za pomnoževanje (glej zgoraj) uporabili še 4

dodatne začetne oligonukleotide: ITS-SF1, ITS-SF2, ITS-SR1, ITS-SR2 (Flot in sod. 2010).

Dodatni oligonukleotidni začetniki za odsek jedrnega gena ITS (Flot in sod., 2010):

ITS SF1	5' - CGCTGCCATTCTCACACTTA - 3'
ITS SR1	5' - ACTCTGAGCGGTGGATCACT - 3'
ITS SF2	5' - AAGGCTATAGCTGGCGATCA - 3'
ITS SR2	5' - TCAGCGGGTAACCTCTCCTA - 3'

Sekvenčne kromatograme smo združili, zaporedja pregledali in uredili v programu Geneious Pro 5.4 (Biomatters Ltd., Nova Zelandija). Urejena zaporedja smo poravnali s programskim paketom MUSCLE (Edgar, 2004) v programu Geneious Pro.

2.2.5 Filogenetske analize

Od začetnih 172 osebkov smo 40 osebkov izključili iz analiz zaradi nepripadnosti *N. stygius* s str. (nekateri so bili *N. podpecanus*, za vse nismo izvedeli) ali neuspešnega poteka visoko specifične PCR. Tako smo v nadaljne analize vključili le 125 osebkov iz 47 nahajališč.

V filogenetske analize smo vključili poravnana nukleotidna zaporedja genov za: COI (125 osebkov); 16S rRNA (41 osebkov) ter ITS (42 osebkov). Pri podskupini 35 osebkov smo uspešno določili nukleotidna zaporedja za vse tri genske odseke. Pri teh smo opravili dodatne analize na posameznih genih ter združenem genskem zaporedju. Pri združitvi genov smo poravnane ITS zaporedje pridružili poravnano 16S rRNA zaporedje in nato še poravnano COI zaporedje. Filogenetske odnose smo ugotavljali z Bayesovim pristopom v programu MrBayes 3.2 (Ronquist in Huelsenbeck 2003) ter BEAST 1.7.1 (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) (Drummond in sod. 2012), ki združuje filogenetske pristope s koalescenčno teorijo.

Ustrezen substitucijski model za posamezen niz podatkov smo ocenili s programom jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) po AIC kriteriju (Akaike information criterion) (Akaike 1974). Pri analizah genov za COI, ITS in analizi združenih zaporedij treh genov smo uporabili GTR+I+G, pri analizah 16S rRNA pa GTR+G substitucijski model. Ker

programi za analizo filogenetskih odnosov ne vsebujejo nujno vseh substitucijskih modelov smo, v primeru podskupine 35 vzorcev gena za ITS, ocenjeni model (K80+G) zamenjali z naslednjim najbolj ustreznim (GTR+I+G).

Za ugotavljanje filogenetskih odnosov v programu MrBayes smo uporabili 5×10^6 generacij, kar je zadostovalo za doseganje konvergence. Stanje hladne verige smo shranili vsakih 500 generacij. Rezultat je zajemal 10.000 dreves, od katerih smo po navodilih avtorjev programa prvo četrtino zavrgli. Zaradi istočasnega poteka dveh hladnih verig, je skupno število dreves na katerih temelji 50 odstotno večinsko drevo soglasja (50 percent majority rule consensus tree), 15.000 za vsako od analiz. Statistično podporo razvejiščem prikazujejo posteriorne verjetnosti.

Veliko primerov kaže, da je iskanje vrstnega drevesa z združevanjem različnih lokusov v določenih primerih lahko zavajajoče (Kubatko, Degnan 2007; Gadagkar in sod. 2005). Zato smo vrstno drevo iskali tudi s programom *BEAST (Heled in Drummond 2010), vključenem v programski paket BEAST. Tako kot MrBayes, tudi *BEAST deluje na osnovi algoritma "Markov Chain Monte Carlo" (MCMC). *BEAST več genskih dreves združi skupaj, v enotno populacijsko drevo, vsa neujemanja med geni pa pripisuje nepopolni ločitvi linij in genskem pretoku. Posamič in skupaj smo analizirali poravnana zaporedja treh genskih odsekov (ITS, COI in 16S rRNA) pri 35 osebkih, za katere smo imeli nukleotidna zaporedja za vse tri odseke. V analizah smo uporabili za vsak gen predhodno določen substitucijski model. Pri vseh nizih podatkov smo vzorčili 35×10^6 generacij, stanje verig pa smo shranili vsakih 3.500 generacij. Od 10.000 tako dobljenih dreves smo zavrgli prvih 100 dreves (1 % po navodilih avtorjev). Statistično podporo izračunanim razvejiščem genskih dreves prikazujejo posteriorne verjetnosti. Pri vseh analizah smo uporabili naključno lokalno molekulsko uro (Random local clock) (Drummond in Suchard 2010), prepustili programu naključno izbiro začetnega drevesa ter nastavili konstantno velikost populacije (constant size population) (Kingman 1982). Pri večlokusni analizi smo za vsako od treh poravnanih zaporedij uporabili svoj substitucijski model in izključili možnost povezave med drevesi. Ostalih nastavitev nismo spreminjali.

Nastala drevesa večinskega soglasja smo pregledali in grafično uredili s programom FigTree 1.3.1 (Rambaut 2006).

V programu Mega 5.1 (Tamura in sod. 2011) smo preverili število variabilnih mest ter število informativnih mest po kriteriju varčnosti pri vseh v raziskavo vključenih nukleotidnih zaporedjih. Število haplotipov in različnih sekvenc smo preverili v programu DAMBE (Data Analysis and Molecular Biology and Evolution) (Xia in Xie 2001).

Mrežno analizo haplotipov (MJ network) smo iskali na podlagi gena za COI (125 osebkov) s postopkom »median joining« (Bandelt in sod. 1999) v programu Network 4.6.1.0.

2. 2. 6 Krivulja kopičenja haplotipov

V programu EstimatesS 8.2.0 (Colwell in sod. 2012) smo preverili kako dobro je povzorčeno območje razširjenosti *N. stygius* z izračunom krivulje kopičenja haplotipov. Krivulja predstavlja naraščanje števila haplotipov kot funkcije mere truda, vloženega v njihovo iskanje (Colwell in Coddington 1994; Zagamajster 2007). Krivuljo kopičenja haplotipov, ki temelji na vzorčenju dobimo s ponavljanjem vzorčenja iz nabora N vzorcev, tako da prikažemo povprečno število haplotipov v 1, 2, ..., N številu vzorcev (Gotelli in Colwell, 2001; Zagamajster 2007). Taka krivulja je statistično pričakovanje naraščanja števila haplotipov ki temelji na našem vzorcu, pri tem pa dobimo tudi intervale zaupanja (Gotelli in Colwell, 2001; Colwell in sod., 2004). Pri izračunih smo uporabili 100 naključnih izbir in izračun krivulje Mao Tau v programu EstimatesS 8.2.0 (Colwell in sod. 2012). Krivulje kopičenja haplotipov smo izračunali za 125 osebkov COI gena, 41 osebkov 16S rRNA gena ter 42 jedrnih zaporedij gena za ITS.

3 REZULTATI

3.1 GENETSKA VARIABILNOST IN KRIVULJE KOPIČENJA HAPLOTIPOV

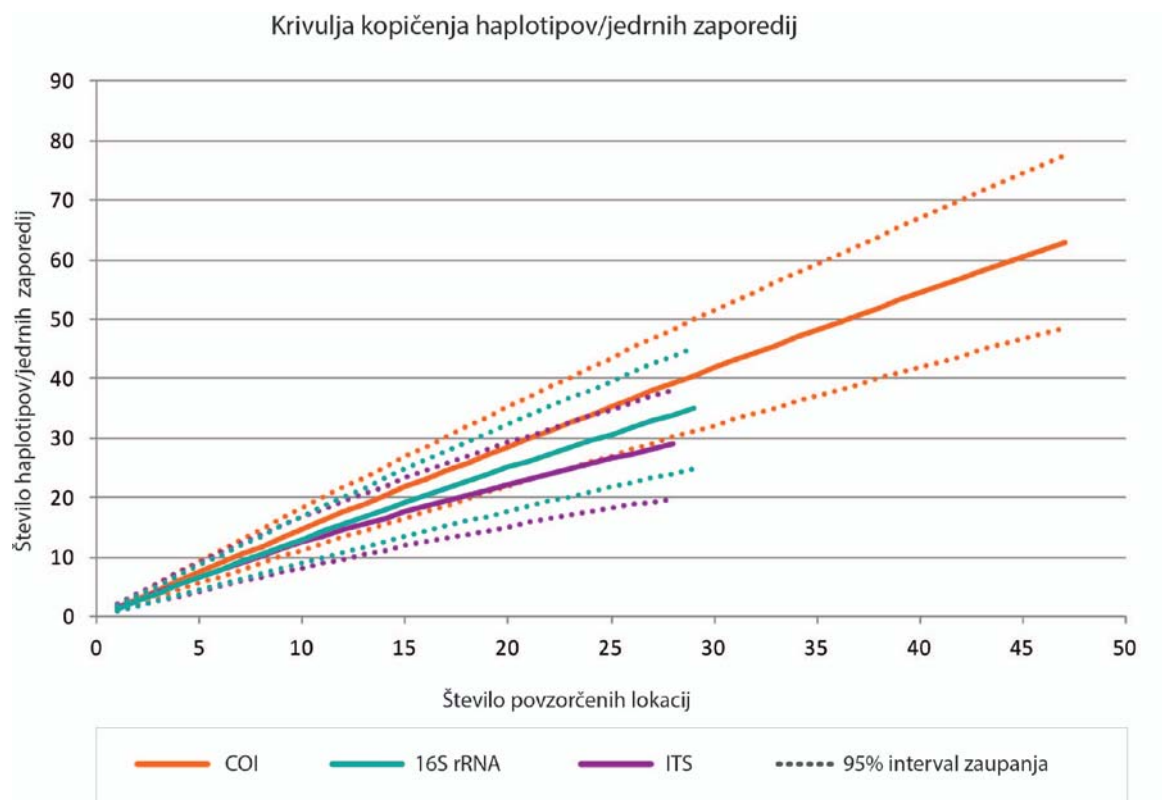
Med tremi analiziranimi geni je bil po pričakovanjih odsek mitohondrijskega gena za COI najbolj variabilen. Z naraščanjem števila analiziranih osebkov narašča tudi število variabilnih mest, informativnih mest po kriteriju varčnosti in haplotipov ali različnih jedrnih zaporedij (Tabela 1).

Tabela 1: Prikaz analiziranih osebkov, dolžine odsekov analiziranih genov, variabilnosti ter števila haplotipov ali različnih jedrnih zaporedij za podskupino 35 osebkov oz. vseh analiziranih osebkov, vrednost v oklepaju.

analizirani gen	št. osebkov	dolžina [bp]	št. variabilnih mest	št. informativnih mest	št. haplotipov/genotipov
COI	35 (125)	592	77 (107)	63 (90)	28 (63)
16S rRNA	35 (41)	967	70 (72)	47 (53)	32 (35)
ITS	35 (42)	1991*	52 (54)	36 (38)	27 (29)

* označuje dolžino poravnanih zaporedij, posamezna se lahko razlikujejo zaradi insercij ali delecij.

Analiza variabilnosti odseka mitohondrijskega gena za COI je pokazala pogosto pojavljanje večjega števila haplotipov na isti lokaciji. Največ haplotipov (5) smo našli v jami Vogršček, kjer smo analizirali 12 osebkov. Največje število osebkov (16) smo analizirani iz Čendove jame, kjer smo našli 2 haplotipa. Haplotipi so večinoma lokalizirani, največkrat prisotni na le eni lokaciji. Samo 6 haplotipov je prisotnih na več kot eni lokaciji, le eden pa je prisoten na treh povzorčenih lokacijah v zgornji Soški dolini (Turjeva jama, potok Šumnik ter v tunelu na Mangartu). Največja razdalja med lokacijama z istim haplotipom je med jamama Vogršček in Tomažinov brezen (39 km). Kljub 47 povzorčenim lokacijam (Slika 4) na relativno majhnem območju število haplotipov narašča in kaže, da med vzorčenjem nismo zajeli vseh haplotipov (Tabela 1, Slika 5). V primeru nobenega od treh analiziranih genov se krivulja kopičenj vrst ne približuje asimptoti, kar bi pomenilo odsotnost novih haplotipov, ki bi jih bilo mogoče vključiti v analizo (Slika 5).



Slika 5: Krivulje kopičenja haplotipov/jedrnih zaporedij za 125 primerkov COI, 41 primerkov 16S rRNA in 42 primerkov ITS gena. Os x prikazuje število povzorčenih lokacij, os y število haplotipov.

Figure 5: Haplotype accumulation curves for 125 COI, 41 16S rRNA and 42 ITS samples. X axis represents number of sampled localities, y axis represents number of haplotypes.

3.2 FILOGENETSKA DREVESA

Vsa filogenetska drevesa, ne glede na obseg podatkov, gen ali metodo, podpirajo monofilijo populacij slepe postranice *N. stygius*, se pa rezultati filogenetskih analiz razlikujejo glede na: I) uporabljeno metodo iskanja filogenetskih dreves; II) glede na analizirano zaporedje gena in; III) število analiziranih osebkov.

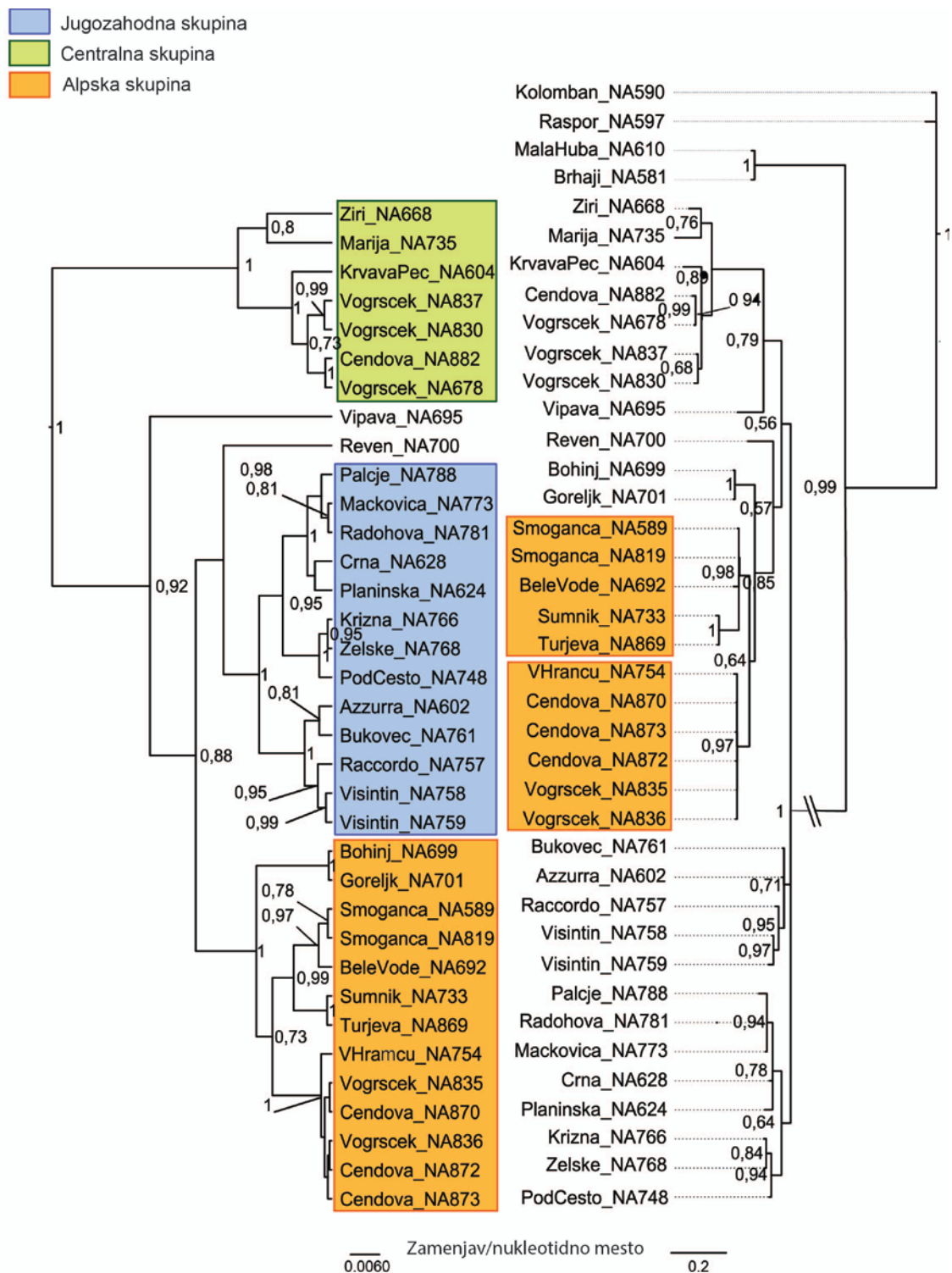
Filogenetska drevesa istih skupin podatkov izračunana z metodama MrBayes in *BEAST so medseboj podobna, vendar imajo razvejišča dreves po Bayesovi metodi nižje podpore. BEAST-ov algoritem je v vseh primerih našel dobro podprte skupine, drevesa izračunana z MrBayes-om pa imajo visoko podprte le majhne skupine iz istega geografskega področja. Po obeh pristopih je podpora bazalnih cepitev slabša od podpore notranjih. .

3.2.1 Analize 35 osebkov in predhodna filogeografska analiza

Ločeno smo obravnavali podskupino 35 osebkov, (Tabela 1, Slike 6-9) pri katerih smo analizirali nukleotidna zaporedja vseh treh genskih odsekov. Topologija dreves se med analiziranimi geni razlikuje. Predvsem so opazne razlike v topologiji dreves mitohondrijskih genov in jedrnega gena (Slike 6-8). Z združevanjem genov v enoten podatkovni niz smo našli drevo, ki je najbolj podobno drevesoma izdelanima na osnovi enega ali drugega mitohondrijskega gena, le z višjimi posteriornimi verjetnostmi (Slika 9).

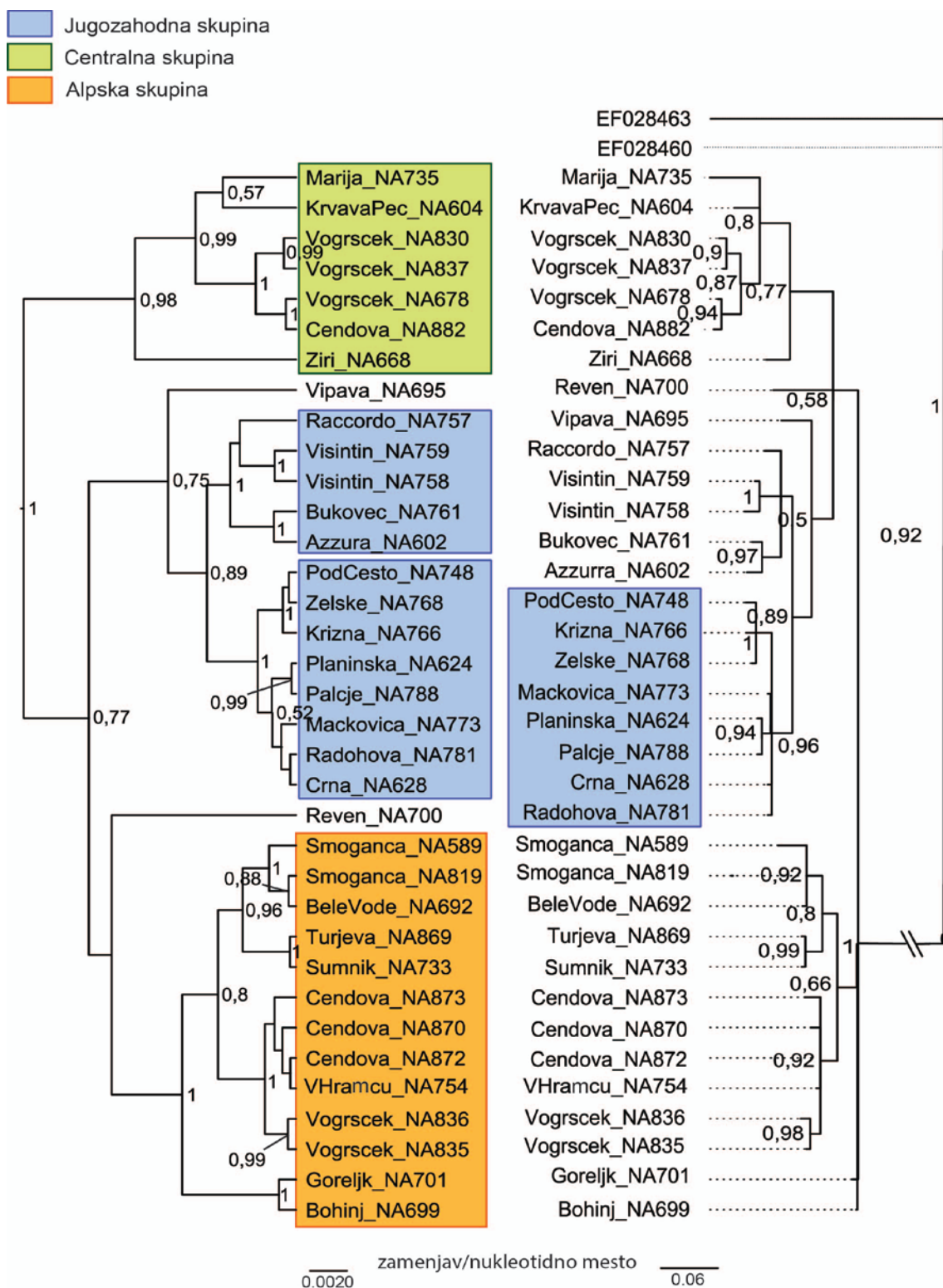
Razmeroma stabilno in dobro razrešeno filogenetsko strukturo ponuja primerjalna analiza na 35 osebkih po metodi *BEAST. Skupine, ki so delno tudi geografsko opredeljene smo poimenovali: (I) Alpska; (II) Centralna in (III) Jugozahodna (Slika 9, Slika 10). Poimenovanje skupin je okvirno in ga uporabljamo le kot vodilo pri oblikovanju nadaljnjih hipotez.

Najbolj podobno strukturo imata filogenetsko drevo gena COI (Slika 6) in drevo, ki je rezultat analize vseh treh genov (slika 9). Podobno strukturo smo rekonstruirali tudi s pomočjo gena 16S, le da pri tem genu sicer enotna Jugozahodna skupina izgubi skupno podporto ter razpade na dve manjši sestrski skupini, omejeni na porečje reke Ljubljanice ter porečje reke Soče in jadranskih rek (Slika 7). Več odstopanj je pri drevesu, ki je rezultat analize jedrnega gena za ITS. Podobni motivi v sekvencah vzorcev iz dveh lokacij v Italiji (Raccordo_NA757, Visintin_NA758, Visintin_NA759) pridruži geografsko oddaljene populacije s severnega dela italijanskega Krasa Alpski skupini. Osebek iz lokacije Bele vode (Trebuša), haplotipsko najbolj podoben haplotipom Alpske skupine, se od alpskih osebkov razlikuje v jedrni sekvenci. Posledice teh neskladij so razpad Alpske in Jugozahodne skupine, dobro podprta in nespremenjena ostane le Centralna skupina.



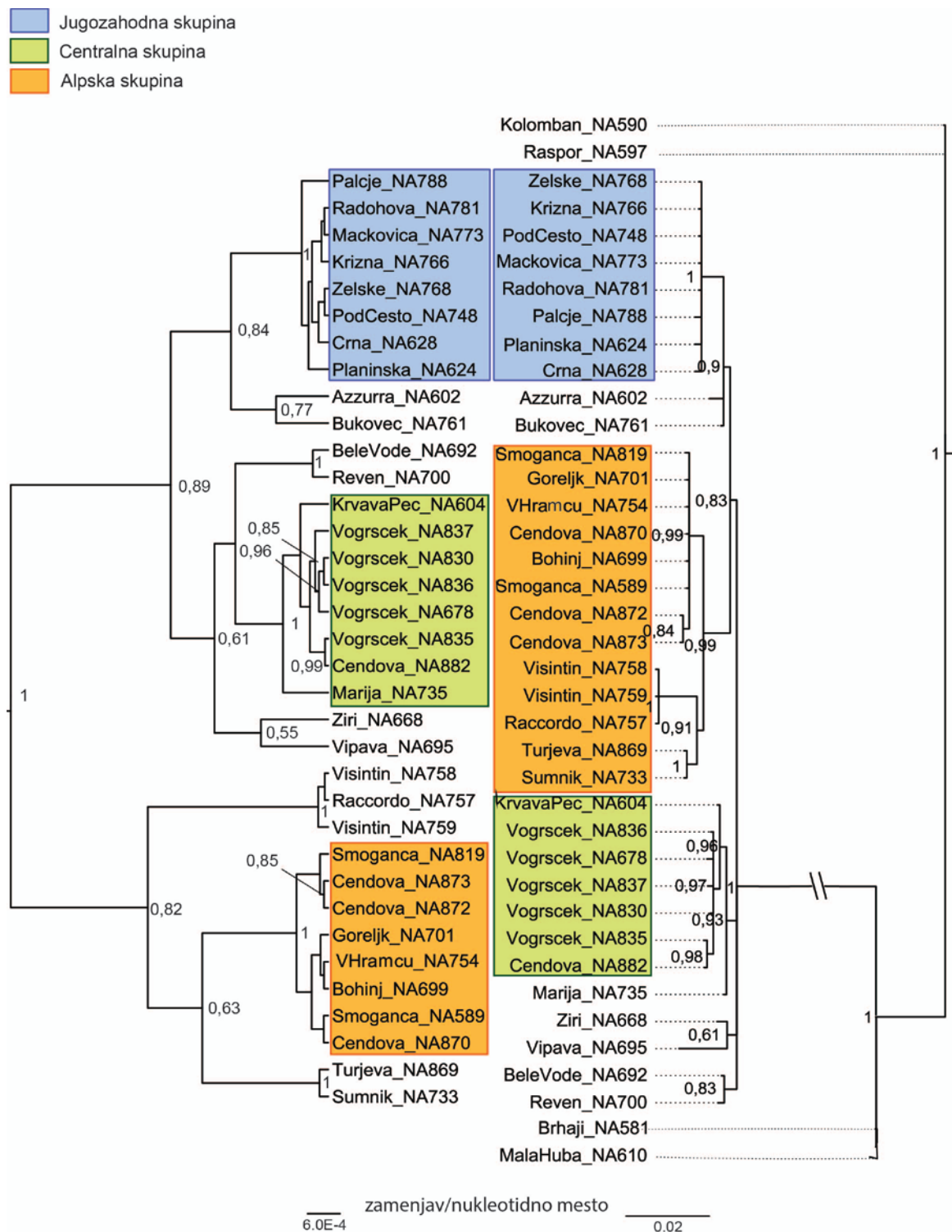
Slika 6: Drevo mitohondrijskih COI zaporedij *Niphargus stygius* izračunpo Bayesovi metodi s programi *BEAST (levo) in MrBayes (desno). Prikazane so posteriorne verjetnosti posameznih cepitev. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po GTR+G+I modelu substitucij.

Figure 6: *Niphargus stygius* COI gene tree calculated with Bayesian inference in *BEAST (left) and MrBayes (right). Posterior probabilities above 0.5 are shown. Branches lengths are relative to number of genetic distances by GTR+G+I substitution model.



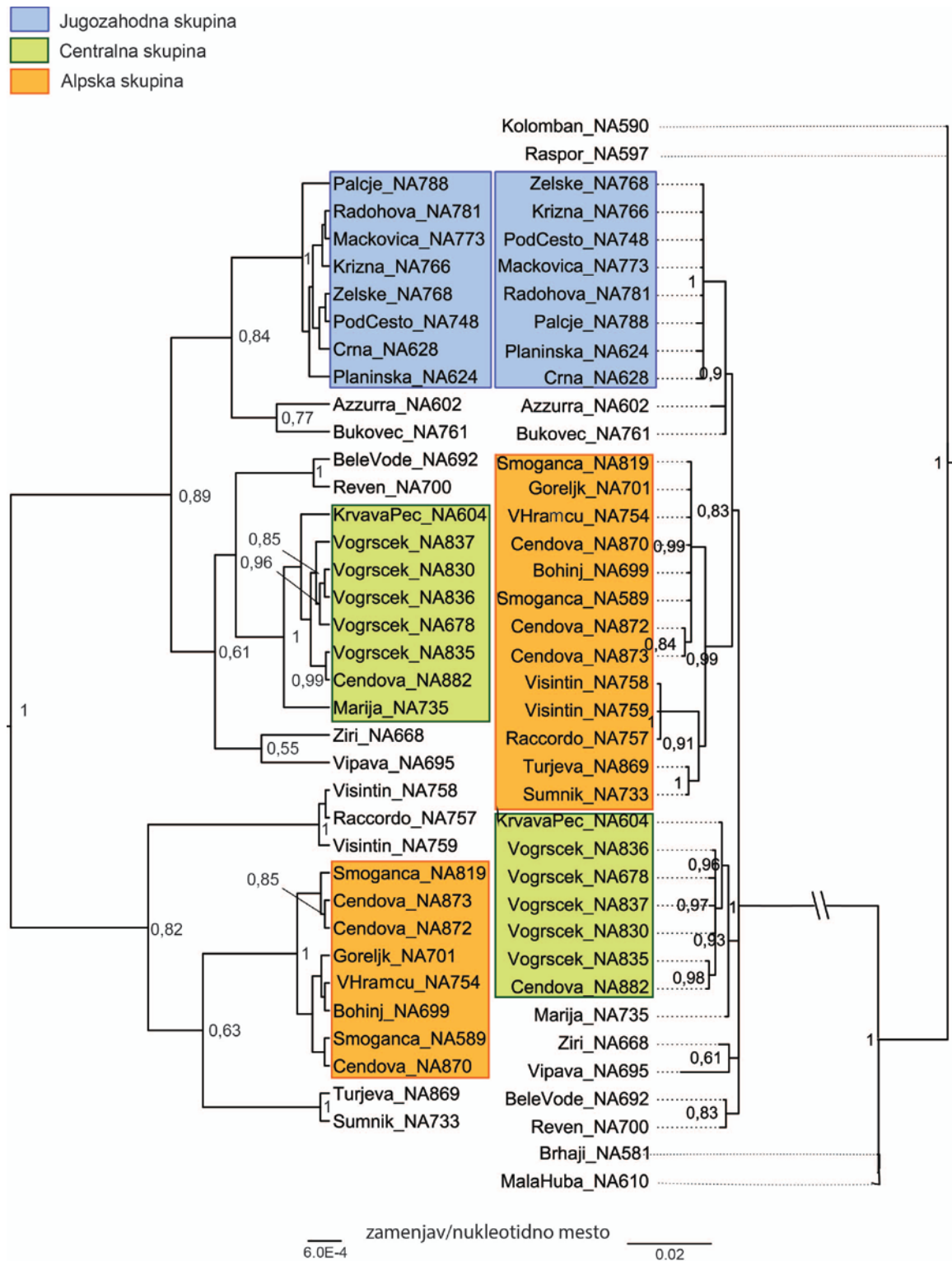
Slika 7: Drevo mitohondrijskih 16S rRNA zaporedij *Niphargus stygius* izračunano po Bayesovi metodi s programi *BEAST (levo) in MrBayes (desno). Prikazane so posteriorne verjetnosti posameznih cepitev. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po GTR+G modelu substitucij.

Figure 7: *Niphargus stygius* 16S rRNA gene tree calculated with Bayesian inference in *BEAST (left) and MrBayes (right). Posterior probabilities above 0.5 are shown. Branches lengths are relative to number of genetic distances by GTR+G substitution model.



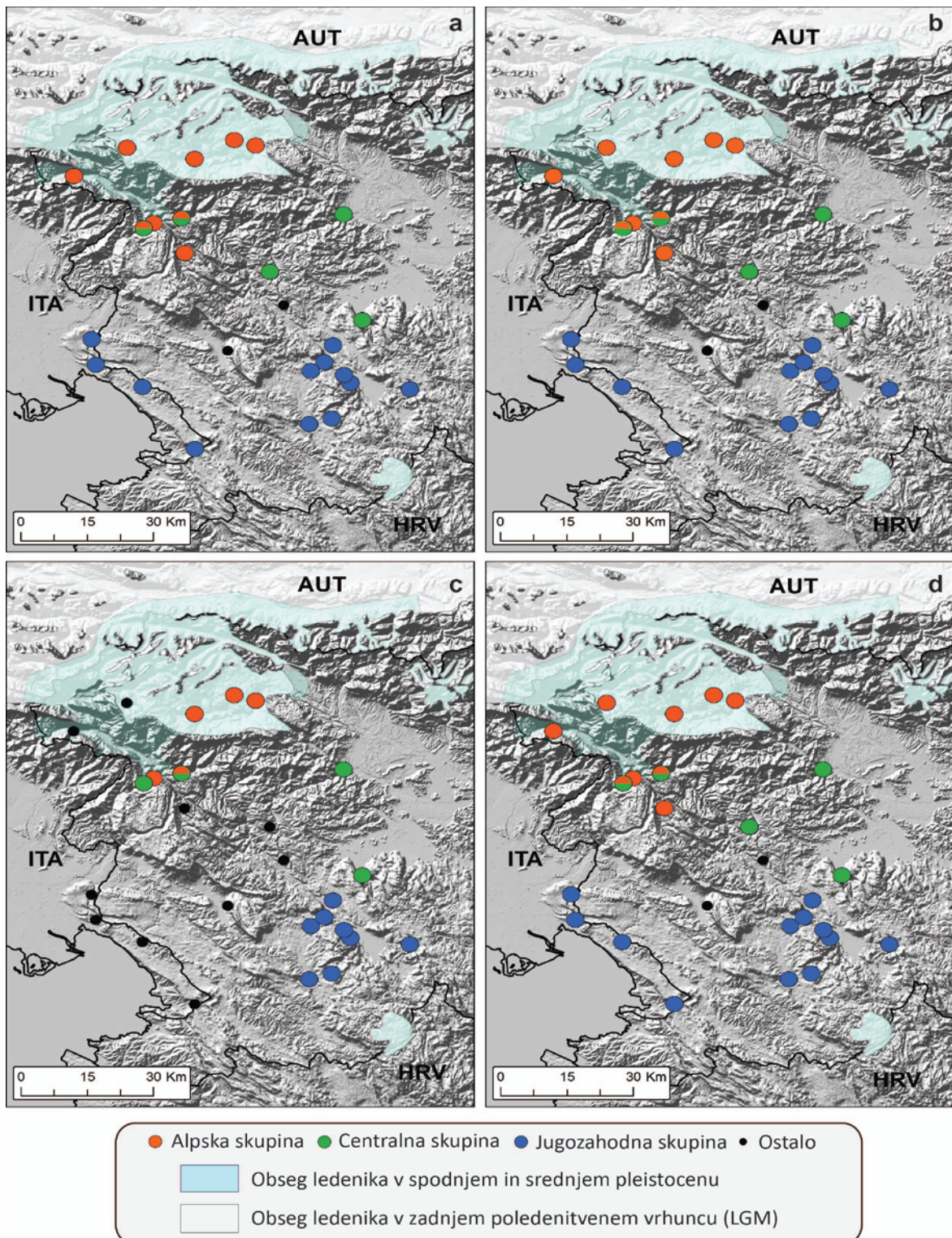
Slika 8: Drevo jedrnih ITS zaporedij *Niphargus stygius* izračunano po Bayesovi metodi s programi *BEAST (levo) in MrBayes (desno). Prikazane so posteriorne verjetnosti posameznih cepitev. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po GTR+G+I modelu substitucij.

Figure 8: *Niphargus stygius* ITS gene tree calculated with Bayesian inference in *BEAST (left) and MrBayes (right). Posterior probabilities above 0.5 are shown. Branches lengths are relative to number of genetic distances by GTR+G+I substitution model.



Slika 9: Drevo združenih ITS, 16S rRNA in COI zaporedij *Niphargus stygius* izračunano po Bayesovi metodi s programi *BEAST (levo) in MrBayes (desno). Prikazane so posteriorne verjetnosti posameznih cepitev. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po GTR+G+I modelu substitucij.

Figure 9: *Niphargus stygius* total evidence tree (COI, 16S rRNA and ITS) calculated with Bayesian inference in *BEAST (left) and MrBayes (right). Posterior probabilities above 0.5 are shown. Branches lengths are relative to number of genetic distances by GTR+G+I substitution model.



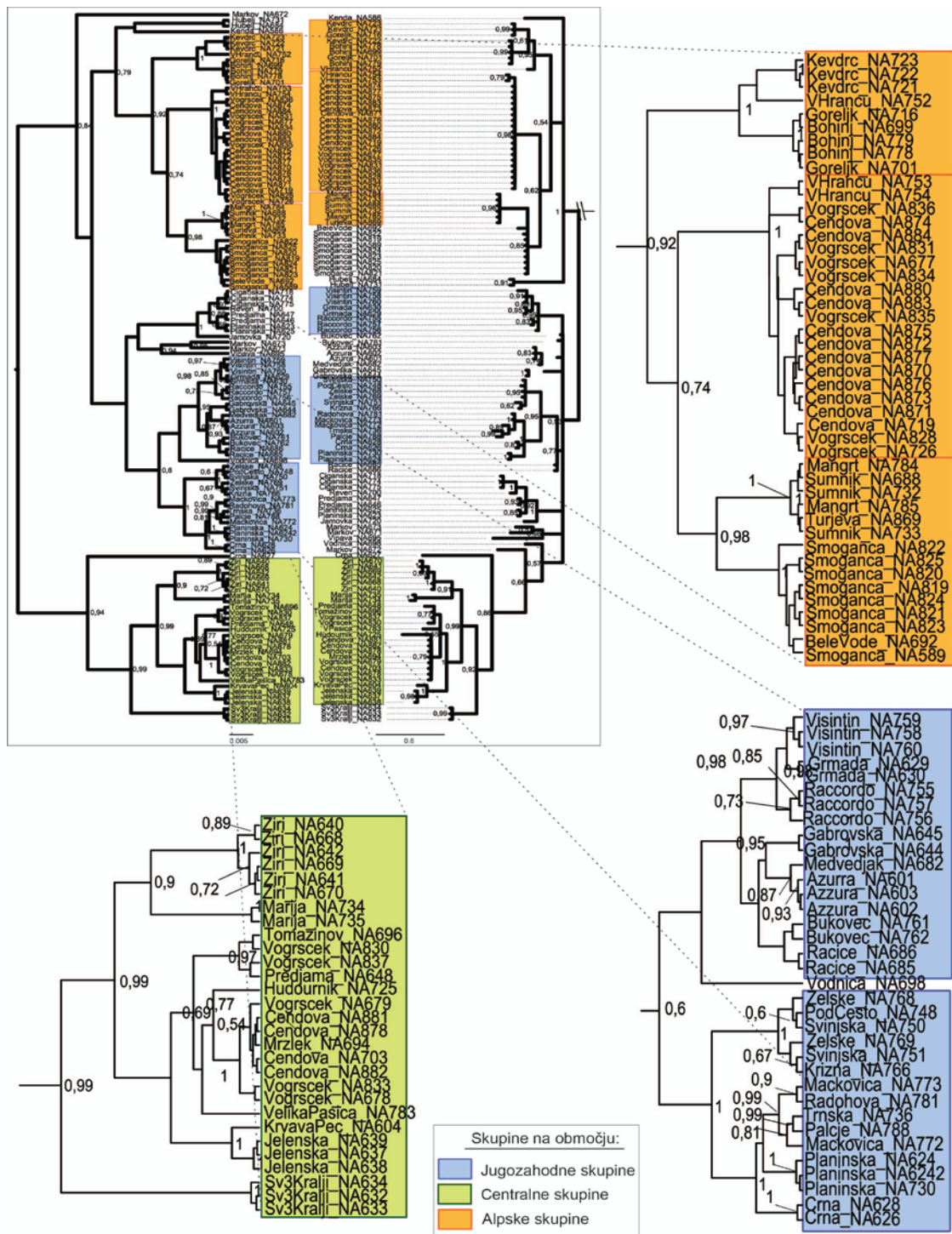
Slika 10: Razširjenost okvirnih filogeografskih skupin slepe postrance *N. stygius* kot rezultat filogenetskih dreves izračunanih po metodi *BEAST na podskupini 35 vzorcev: a) gena za COI, b) gena za 16S rRNA, c) gena za ITS in d) združenih zaporedij treh genov.

Figure 10: *Niphargus stygius* phylogeographic groups areal, based on 35 samples dataset calculated in *BEAST for: a) COI gene, b) 16S rRNA gene, c) ITS gene, d) total evidence (COI, 16S rRNA, ITS).

3.2.2 Analize z več osebki in mreža haplotipov

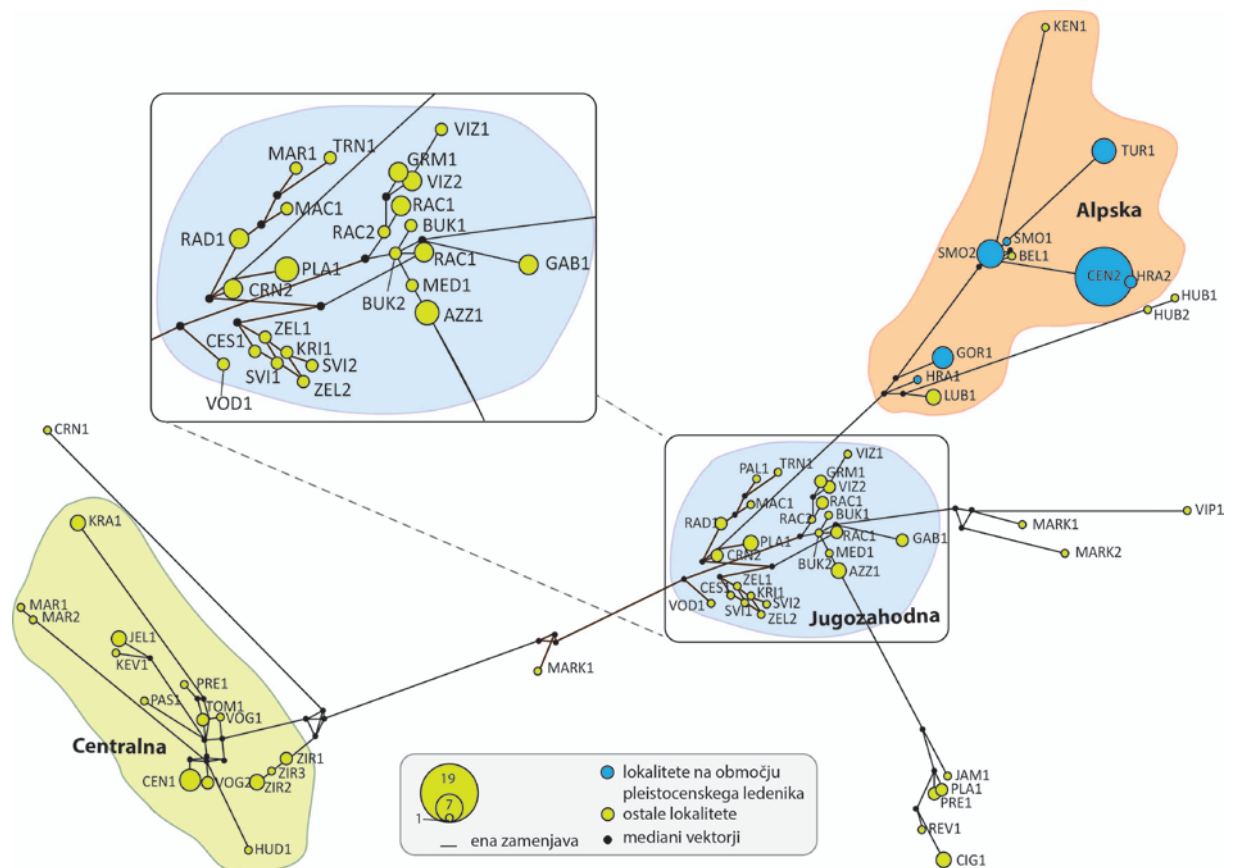
Dodatno smo iskali filogenetska drevesa polnega obsega podatkov, ki so zaradi podobnosti z drevesi podskupine 35 osebkov ali obširnosti prikazana na sliki 11 ter v prilogah (Priloge A,B). Z dodajanjem osebkov v analizo se struktura dreves na posameznih genih spreminja v različnem obsegu. Pri filogenetskem drevesu na osnovi gena 16S rRNA povečanje števila osebkov s 35 na 41 poveča statistično podporo Jugozahodne in Alpske skupine. Vendar v primeru analize s programom MrBayes ne prepoznamo več Centralne skupine. V primeru gena za ITS dodatni vzorci ne vplivajo na spremembo filogenetskega drevesa (Priloga B). Najbolj opazne spremembe so v strukturi drevesa izdelanega za gen COI, kjer smo analizirali štirikrat več osebkov. Podpora trem velikim skupinam (Slika 6, 10, Slika 12, glej tudi 3.2.1) ni več tako visoka; Jugozahodna skupina razpade na dve podskupine, katerih skupni izvor ni več nedvoumno podprt. Večje število osebkov je nerazporejenih in geografske meje med domnevnimi tremi filogeografskimi skupinami niso več tako ostre. Drevesa gena COI odkrivajo številne sintopo pojavljajoče se osebke. Gre za osebke iz Jugozahodne in Centralne skupine ter osebke, ki se ne uvrščajo v nobeno izmed skupin, ki jih najdemo skupaj vzdolž mejnega območja med Jugozahodno in Centralno skupino (Slika 10, Priloga C).

Nejasno hierarhično strukturo, ki so jo pokazala filogenetska drevesa, je potrdila tudi mrežna analiza haplotipov (slika 12). Rezultat mrežne analize so tri večje skupine, vmes pa je nekaj posameznih haplotipov, ki so večje število mutacij oddaljeni od vseh ostalih. Skupine so medsebojno oddaljene 13 ali več mutacijskih korakov, ravno tako tudi nerazporejeni haplotipi. Medsebojno najbolj oddaljeni sta Centralna in Jugozahodna skupina, kjer se število mutacijskih korakov podvoji. V Alpski skupini je opaziti razvoj dodatnih haplotipov iz osrednjega haplotipa in migracijo, ki je potekal z robnega dela ledenika proti severu in vzhodu. Ravno tako je opaziti kar nekaj haplotipov, ki so oblikovali manjše skupine, ki ne pripadajo nobeni od domnevnih skupin, prav tako kot na filogenetskemu drevesu COI gena (Slika 11). Preglednica vseh haplotipov s pripadajočimi lokalitetami je podana v prilogi E



Slika 11: Drevo mitohondrijskega COI gena (125 osebkov) *Niphargus stygius* izračunano po Bayesovi metodi s programom *BEAST (levo) in MrBayes (desno). Filogenetske skupine so povečane zunaj okvira. Prikazane so posteriorne verjetnosti posameznih cepitev. Dolžine vej so sorazmerne genetskimi razdaljami po GTR+G+I modelu substitucij.

Figure 11: *Niphargus stygius* COI gene tree (125 specimens) calculated with Bayesian inference in *BEAST (left) and MrBayes (right). Phylogenetic groups are enlarged outside the frame. Posterior probabilities above 0.5 are shown. Branches lengths are relative to number of genetic distances by GTR+G+I substitution model.



Slika 12: Mrežna analiza haplotipov po metodi »median-joining«. Velikost kroga je sorazmerna frekvenci določenega haplotipa. Črne pike predstavljajo manjkajoče ali nepovzorčene haplotipe.

Figure 12: Haplotype network based on »median joining«. Circle diameter is relative to frequency of haplotypes. Dots are representing missing or unsampled haplotypes.

4 RAZPRAVA

4.1 FILOGENETSKA STRUKTURA IN PREŽIVETJE POD LEDOM

Na osnovi poravnanih združenih genskih zaporedij (35 osebkov), filogenetska drevesa kažejo obstoj vsaj treh, deloma geografsko ločenih linij *N. stygius*: (I) Alpska; (II) Jugozahodna in (III) Centralna.

Alpska skupina poseljuje območja dveh nekdanjih, pleistocenskih ledenikov; Soškega in Bohinjskega ter sosednjih ledeniških dolin, ki so bile pod njihovim vplivom. Rezultati skupne analize kažejo, da se haplotipi skupine ne pojavljajo zunaj ledeniškega območja. Podatki kažejo, da je *N. stygius* ena izmed izjem splošno sprejete hipoteze o siromašenju stigobiotske favne v času zadnjega poledenitvenega vrhunca (Proudlove s sod. 2003; Gibert in Culver 2009). Centralna skupina poseljuje območje osamelega krasa vzhodno od reke Idrijce do Škofje Loke ter na jugu do južnega roba Ljubljanskega barja. Zaradi pomanjkljivega vzorčenja s podatki, ki jih imamo na voljo, meje razširjenosti skupine niso jasne in jih bo treba še razjasniti v vključitvijo novih vzorcev; šele po tem bomo lahko sklepali, kateri dogodki so vodili do izolacije te skupine. Jugozahodna skupina poseljuje področje zahodno od Trnovskega roba, porečja Ljubljanice ter rek jadranskega povodja. Zunanja območja razširjenosti vrste naseljujejo le pripadniki posamezne filogenetske skupine. Nasprotno v osrednjem delu razširjenosti – na mejah razširjenosti skupin – dobimo simpatrično, oz. celo sintopo pojavljajoče se primerke različnih filogenetskih skupin. Drevesa ITS in 16S rRNA kažejo sintopo pojavljajoče se osebke iz Centralne in Alpske skupine na robnem območju pleistocenskega ledenika – jamah v dolini reke Bače in Idrije.

Filogenetska drevesa, nakazanost skupin na mreži haplotipov in razmeroma velike razdalje med njimi podpirajo strukturiranost populacij *N. stygius* ter tako nedvoumno nasprotujejo hipotezi o panmiktični populaciji, razširjeni na celotnem območju razširjenosti vrste. Sam strukturni vzorec lahko pojasnimo le deloma, saj zaenkrat znamo pojasniti samo vzrok nastanka Alpske skupine, ne pa tudi dveh skupin, razširjenih zunaj pleistocenskega ledeniškega območja, ena od možnosti bi pa lahko bila hidrografska izolacija v preteklosti. Glede na morfološko enotnost populacij *N. stygius* znano iz predhodnih raziskav (Jakopin

1976) in genetsko strukturiranost populacij raziskano v tej nalogi, menimo da gre v primeru vrste *N. stygius* za eno, splošno razširjeno vrsto na področju Z Slovenije in ne za skupino kriptičnih vrst.

Populacijska sestava treh filogenetskih skupin za zdaj še ni popolnoma jasna zaradi konflikta v podatkih. Alpski skupini se na drevesu jedrnega gena za ITS, s slabo statistično podporo, priključijo osebki z lokalitet na severovzhodu Italije (Slika 8, Priloga B), medtem ko ostale lokalitete iz italijanskega krasa tvorijo Jugozahodno skupino. Prostorska ločitev teh osebkov od matične Alpske skupine bi bila lahko posledica disperzije vzdolž toka podzemeljskih voda in površinskih voda ali nepopolnega razvrščanja genetskih linij. Disperzijska pot bi bila lahko Soča, ki povezuje vode iz alpskega območja z omenjenima lokalitetama. Podoben primer disperzije z driftom vzdolž reke Ain v vzhodni Franciji navajajo za vrsto *N. rhenorodanensis* (Léfebure in sod. 2007). V isti študiji hkrati poudarjajo majhne disperzijske sposobnosti postranic, podprte s prostorsko lokaliziranimi haplotipi, kar se v precejšnji meri ujema z našimi podatki. O driftu postranic obstajajo številni literaturni podatki, o driftu slepih postranic pa so poročali prav iz območja razširjenosti *N. stygius*, vzdolž toka reke Bače (Mori in Brancelj 2011). Za bolj izčrpno študijo znotrajvrstnih genealoških odnosov, s katero bi lahko prišli do odgovorov o zgodovinskih procesih in dogodkih, ki so prispevali k kompleksni strukturi *N. stygius* smo analizirali premajhno število osebkov.

Ne glede na razlog za neskladje v sestavi alpske skupine rezultati kažejo na možnost preživetja populacij *N. stygius* pod pleistocenskimi ledeniki ali na obstoj refugija na robu ledenikov. Sekundarna kolonizacija nekdanjega ledeniškega območja je zelo verjetna, saj se, sodeč po mrežni analizi haplotipov (Slika 12), predniški haplotipi dela Alpske skupine pojavljajo na robnemu območju pleistocenskih ledenikov. Pestrost haplotipov Alpske skupine je v primerjavi z drugimi skupinami nižja, isti haplotip pa je razširjen na večih lokacijah znotraj zgornje soške doline. Omenjeni rezultati kažejo na možnost recentne disperzije znotraj Alpske skupine. Menimo, da je v času poledenitev na robovih ledenikov prišlo do vzpostavitve ekološke bariere in genetske izolacije ter diferenciacije lokalnih populacij. Mejo med populacijami je predstavljal ledenik in območje pod njegovim vplivom; populacije zmožne preživetja so bile v mejnem območju ali severno od njega, v južnih legah pa so ostale populacije neprilagojene nizkim temperaturam. Novejše študije

kažejo, da so vrste iz večih rodov postranic preživele zadnji poledenitveni vrhunec pod ledom, bodisi v subglacialih refugijih ali nunatakih (osamelih gorskih vršakah ki niso pokriti z ledeniško maso) (Kornobis s sod. 2010; Kornobis s sod. 2011; Léfébure in sod. 2007; Hänfling in sod. 2008). Preživetje vrst *Crangonyx islandicus* in *Crymostygius thigvallensis* naj bi omogočil sistem špranj v matični kamnini, napolnjen s toplimi geotermalnimi vodami na meji tektonskih plošč Islandije (Kornobis s sod. 2010, 2011). Drugačno strategijo preživetja poznamo pri vrsti *N. rhenorodanesis*, ki je pleistocen preživela pod ali v refugijih na robu alpskih ledenikov v vzhodni Franciji (Léfébure in sod. 2007). Osebkki te vrste kažejo neobičajne vedenjske in metabolne prilagoditve življenju v hladni vodi (npr. $T < 3\text{ °C}$); zvišana koncentracija krioprotektantov, ogljikovih hidratov glikogena in trehaloze ter aminokislin alanina in glicina (Isartell s sod. 2005, 2006; Colson-Proch s sod. 2010). Podoben scenarij je, sodeč po podatkih, mogoče pričakovati tudi v primeru slepe postranice *N. stygius*. Po koncu ledene dobe in taljenju ledeniške mase je prišlo do sekundarnega kontakta med okoliškimi in populacijami pod ledom ter vzpostavitve con sintopega pojavljanja skupin, vzdolž meja razširjenosti posameznih skupin.

Prostorska razporeditev haplotipov Jugozahodne skupine sledi jadransko-črnomorski razvodnici. Sestavljata jo dve manjši podskupini, ki se geografsko ujemata z recentnima povodjema, Jadranskim in Donavskim (Uhan in Bat 2003). K donavskemu povodju prispevajo vode vzhodno od razvodnice (vode z 80 % površine RS). V primeru *N. stygius* gre za haplotipe Jugozahodne skupine vezane na prispevno območje reke Ljubljanice. Vode zahodno od razvodnice (vode z 20 % površine RS) prispevajo k jadranskemu povodju. S tem se ujema tudi razporeditev dela haplotipov Jugozahodne skupine, vezanih na porečje Soče ter povodja jadranskih rek. Kljub jasni prostorski razporeditvi dveh podskupin z današnjimi povodji težko pojasnimo gensko strukturiranost vrste *N. stygius*.

4.2 VPLIV POVEČANEGA ŠTEVILA PRIMERKOV ALI GENOV

Struktura, ki jo kaže drevo s 35 osebki se ob dodajanju novih osebki v analizo in naraščanju števila haplotipov spremeni; opaziti je več nastalih politomij, odnosi med skupinami pa so nerazrešeni (Slika 11). Podoben vzorec je znan pri kobilicah, znotraj kompleksa *Stenopelmatus 'mahogani'* (Vandergast in sod. 2007), kjer je vzrok

politomijam bila prekinitev genskega pretoka kot posledica fragmentacije habitata. Tako filogenetska drevesa, kot tudi mrežna analiza haplotipov kažejo kompleksno filogeografsko zgodovino *N. stygius*. Politomije prisotne na filogenetskih drevesih so v primeru *N. stygius* lahko posledica različnih zgodovinskih dogodkov: prekinitve ali prekinitve in ponovnega genskega pretoka ob spremembah površinskih in podzemeljskih vodnih tokov ter podzemeljskih habitatov in nepopolnega razvrščanja genetskih linij ali istočasnega nastanka nekaterih manjših skupin ter njihove recentne radiacije.

Neskladnost med mitohondrijskimi in jedrnimi filogenetskimi drevesi je pogost pojav, ki so ga opazili med različnimi skupinami organizmov: kvasovkami (Rokas in sod. 2003), lepenci (Gomez-Zurita in Vogler 2003), krešiči (Sota in Vogler 2001), sončnimi ostrži (Near in sod. 2004), bodičastimi legvani (Leaché 2010), sklednicami (Spinks in Shaffer 2009), listojedimi opicami (Ting in sod. 2008) in drugimi. Drevesa si pri *N. stygius* ne nasprotujejo samo med slabo podprtimi skupinami, ampak tudi tistimi z dobro podporo. Osebkni glede na mitohondrijski ali jedrni gen pripadajo različnim skupinam. Takšne razlike je možno razložiti z različno filogenetsko zgodovino jedrne in mitohondrijske DNA, kombiniranje takšnih rezultatov pa lahko vodi k napačnim filogenetskim drevesom vrste (Wiens 1998). Najbolj pogosti razlagi za neskladje sta nepopolno razvrščanje linij in introgresija. Pogosto so mutacije edini vir genetske variabilnosti mitohondrijske DNA; hitra evolucija in kopičenje mutacij pa omogočata obstoj velikega števila haplotipov v populaciji (Avice 2009). Nasprotno so jedrni geni podvrženi rekombinaciji, s tem tudi počasnejši evoluciji nuklearnih lokusov in manjši variabilnosti v primerjavi z mitohondrijsko DNA (Edwards in Bensch 2009), kar se je pokazalo tudi v primeru *N. stygius*. Skladnost jedrne in mitohondrijske DNA v filogeografskih raziskavah pa zaupanje v rezultat še podkrepi (Avice 2000). V našem primeru se, z večanjem števila genskih markerjev uporabljenih v analizi, povečujejo statistične podpore razvejišč in oblikujejo statistično podprte filogenetske skupine (z obema algoritmoma). Skupno filogenetsko drevo je po topologiji bolj podobno mitohondrijskim drevesom, razlago za to pa lahko iščemo v povečani količini filogenetskega šuma na drevesih jedrnega gena. (Slika 9, Tabela 1, Slika 5). Zaradi nekaterih, sicer majhnih neskladnosti med drevesi in kritičnega vrednotenja rezultatov skupne analize vseh treh genov menimo, da bi bilo smiselno v prihodnje raziskave vključiti dodatne genske markerje, predvsem jedrnega genoma.

Čeprav je od opisa slepe postranice poteklo že skoraj 200 let, *N. stygius* še vedno ostaja precejšnja neznanka. Z uporabo sodobnih molekularno genetskih metod še vedno nismo razrešili filogeografske problematike vrste. Smo pa pokazali vpliv pleistocenskih poledenitev na gensko strukturo danes obstoječih populacij. Nadaljnje analize zahtevajo vključitev dodatnih osebkov, še zlasti pa dodatnih jedrnih genskih markerjev, ki bi podprli ali spremenil obstoječo genetsko strukturiranost vrste. Poglobljene filogeografske analize pa bi nam lahko pomagale najti odgovore na vprašanja, kateri dogodki in procesi so prispevali k tako pestri in kompleksni genetski strukturi slepe postranice *N. stygius*. Glede na temperaturno evriekost in povečano število lokacij s sintopo pojavljujočimi se osebki, raziskavo bi bilo smiselno nadaljevati in nadgraditi z analizami sintopih populacij, disperzijskega potenciala ter ekofiziološkimi raziskavami. Vrsta očitno tolerira širok spekter okoljskih dejavnikov, območje razširjenosti vrste, na meji med dinarsko in alpsko biogeografsko regijo, pa kot vir zapletenih in strukturiranih biogeografskih vzorcev.

5 SKLEPI

- Filogenetske analize kažejo, da so populacije *N. stygius* na severu območja razširjenosti vrste pleistocensko poledenitev preživele pod ledenikom ali v refugijih v njegovi neposredni bližini.
- Analize zaporedij genov za COI, 16S rRNA in ITS kažejo, da je *N. stygius* monofiletska skupina, z vsaj tremi nakazanimi in nepopolno razrešenimi linijami: (I) Alpska; (II) Jugozahodna; (III) Centralna
- Jedrni in mitohondrijski podatki podpirajo različna genska drevesa, v skupni analizi pa jedrni geni niso enakovredno zastopani. V bodoče raziskave je treba vključiti dodatne, zlasti jedrne, genske markerje
- Na podlagi dosednjih raziskav ne moremo razložiti kompleksne filogeografske skrukture slepe postranice *N. stygius* in vzroke ter procese, ki so jo oblikovali.
- V primeru vrste *N. stygius* imamo opraviti z eno samo vrsto, razširjeno po celotni zahodni Sloveniji in vzhodni Italiji.

6 POVZETEK

Slepa postranica *Niphargus stygius*, Schiödte 1849 poseljuje podzemeljske habitate krasa Osrednje, Jugozahodne in Severozahodne Slovenije. Z opisom vrste je postala nominalna vrsta rodu *Niphargus*. Od takrat do danes je večkrat bila objekt izčrpnih morfoloških raziskav, ki niso zadovoljivo pojasnile opažene morfološke variabilnosti. Vrsta poseljuje dve biogeografski regiji in višinski pas od 1600 m s temperaturinim gradientom od 12 do 0 °C; poseljuje tudi območje pleistocenskih ledenikov. Nenavadne lastnosti območja razširjenosti vrste v številnih ozirih nasprotujejo dvema hipotezama o podzemeljske favne, namreč da so podzemeljske živali slabo mobilne ter da so temperaturno steneke. Namen diplomske naloge je raziskati filogenetske in filogeografske odnose med populacijami *N. stygius* ter ugotoviti ali gre za samostojno vrsto ali skupino morfološko enakih - kriptičnih vrst.

Analizirali smo 125 osebkov *N. stygius* iz 47 različnih lokalitet z celotnega območja razširjenosti vrste. Kjer je bilo mogoče, smo v analizo vključili več osebkov, največ 16. Po uspešni izolaciji DNA smo v verižni reakciji s polimerazo (PCR) pomnožili odseke dveh mitohondrijskih (COI in 16S rRNA) ter enega jedrnega gena (ITS). Temu je sledilo čiščenje pridobljenih produktov in nato določitev nukleotidnih zaporedij, ki smo jih nato vključili v filogenetske analize. Z dvema programoma, temelječima na Bayesovu pristopu, MrBayes in BEAST, smo analizirali zaporedja in iskali filogenetska drevesa za posamezne genske odseke in gensko zaporedje nastalo z združitvijo treh genov.

Vsa filogenetska drevesa so potrdila monofilijo vrste in potrdila obstoj treh nakazanih in statistično deloma podprtih linij: (I) Alpske; (II) Jugozahodne; (III) Centralne. Vrsta se je iskazala kot genetski pestra, saj kljub velikem številu lokacij, vključenih v analize, nismo zajeli vseh haplotipov. Filogeografske analize so pokazale, da ni splošno razširjenih haplotipov ter da ima vrsta slabe disperzijske zmožnosti, kar je v skladju z uveljavljeno paradigmo o slabih disperzijskih zmožnostih podzemeljske favne. Glede na strukturo dreves lahko sklepamo, da so pleistocenski dogodki vplivali na genetsko diferenciacijo nekaterih populacij, ki so pleistocenske poledenitve preživele pod ledeniškim pokrovom. Vključitev dodatnih vzorcev v analizo je povzročilo rahljanje obstoječih odnosov znotraj vrstnih filogenetskih dreves in zbrisala jasne meje med skupinami. Glede na dejstvo, da

mitohondrijski in jedrni genom kažeta deloma različno, menimo, da bi za trdnejše zaključke morali analizirati dodatne genske markerje.

7 VIRI

7.1 CITIRANI VIRI

- Agencija Republike Slovenije za okolje. 2006. Podnebne razmere v Sloveniji (Obdobje 1971-2006). 28 str.
- Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. IEEE Transactions on Automatic Control, 19, 6: 716–723
- Avise J. C. 2000. Phylogeography. Cambridge, Harvard University Press: 464 strani
- Avise J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. Journal of Biogeography, 36: 3-15
- Bandelt H-J., Forster P., Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 16: 37-48
- Bat L., Akbulut M., Sezgin M., Çulha M., 2001. On the Occurrence of *Niphargus valachicus* Dobrenau & Manolache, 1933 (Amphipoda, Gammaridae) in the Western Black Sea Region of Turkey. Turkish Journal of Zoology 25: 235-239
- Bavec M. Po kvartarju...kvartar (Quaternary lives). 2007. Geologija, 50(2): 343-346
- Bavec M., Tulaczyk S.M., Mahan S.A., Stock G. 2004. Late Quaternary glaciation of the Upper Soča River Region (Southern Julian Alps, NW Slovenia). Sedimentary Geology, 165: 265-283
- Bavec M., Verbič T. 2011. Glacial history of Slovenia. V: Developments in Quaternary sciences, Vol. 15. Ehlers J., Gibbard P.L., Hughes P.D. (ur.) Amsterdam, Elsevier: 385-392
- Bickford D., Lohman D.J., Sohdi N.S., Ng P.K.L., Meier R., Winker K., Ingram K.K., Das I. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends in Ecology and Evolution, 22, 3: 148-155
- Botosaneanu L. 1986. Stygofauna mundi: A faunistic, distributional and ecological synthesis of the world fauna inhabiting subterranean waters. Leiden, Brill: 740 str.
- Colson-Proch C., Renault D., Gravot A., Douady C., Hervant F. 2009. Do current environmental conditions explain physiological and metabolic responses of subterranean crustaceans to cold?. The Journal of Experimental Biology, 212: 1859-1868
- Colwell R.K., Coddington J.A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. Philosophical Transactions of the Royal Society in London, B, 345: 101-118
- Colwell R.K., Xuan M.C., Jing C. 2004. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. Ecology, 85, 10: 2717-2727

- Colwell R. K., Chao A., Gotelli N. J., Lin S. Y., Mao C. X., Chazdon R. L., Longino J. T. 2012. Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation, and comparison of assemblages. *Journal of Plant Ecology*, 5: 3-21
- Culver D.C., Pipan T. 2009. *The Biology of Caves and Other Subterranean Habitats*. 1. izdaja. Oxford, Oxford university press: 254 str.
- Danielopol D., Rouch R. 2012. Invasion, active versus passive. V: *Encyclopedia of caves*. White W.B., Culver D.C. (ur.). Amsterdam, Elsevier Press: 404-409
- Degnan J.H., Rosenberg N.A. 2009. Gene tree discordance , phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology and Evolution*, 24, 6: 332-340
- Drummond A.J., Suchard M.A. 2010. Bayesian random local clocks, or one rate to rule them all. *BMC Biology*, 8, 114: 1-12
- Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 5: 1792-1797
- Edwards S., Bensch S. 2009 Looking forward or looking backwards in avian phylogeography? A comment on Zink and Barrowclough 2008. *Molecular Ecology*, 18: 2930–2933
- Fišer C. 2012. *Niphargus*: A model system for evolution and Ecology. V: *Encyclopedia of caves*. White W.B., Culver D.C. (ur.). Amsterdam, Elsevier Press: 555-564
- Fišer C., Sket B. in Stoch F. 2006. Distribution of four narrowly endemic *Niphargus* species (Crustacea: Amphipoda) in the western Dinaric region with description of a new species. *Zoologischer Anzeiger*, 245: 77–94
- Fišer C., Sket B. in Trontelj P. 2008. A phylogenetic perspective on 160 years of troubled taxonomy of *Niphargus* (Crustacea: Amphipoda). *Zoologica scripta*, 37: 665-680
- Fišer C., Zagamajster M., Zakšek V. 2012. Coevolution of life history traits and morphology in female subterranean amphipods. *Oikos* [v tisku]
- Fišer Ž. 2011. Znotrajvrstna raznolikost istrske slepe postranice *Niphargus krameri*. Diplomsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 33 strani
- Flot J.F., Wörheide G., Dattagupta S. 2010. Unsuspected diversity of *Niphargus* amphipods in the chemoautotrophic cave ecosystem of Frasassi, central Italy. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 1-13
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-297

- Folquier A., Malard F., Lefébure T., Douady C.J. & Gibert J. 2008. The imprint of Quaternary glaciers on the present-day distribution of the obligate groundwater amphipod *Niphargus virei* (Niphargidae). *Journal of Biogeography*, 35: 552-56
- Gadagkar S. R., M. S. Rosenberg, S. Kumar. 2005. Inferring species phylogenies from multiple genes: Concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *Journal of Experimental Zoology*, 304B: 64-74
- Geyer C.J. 1991. Markov chain Monte Carlo maximum likelihood. V: *Computing Science and Statistics. Proceedings of the 23rd Symposium on the Interface*: 156–163
- Gibert J., Culver D.C. 2009. Assessing and conserving groundwater biodiversity: an introduction. *Freshwater Biology*, 54 : 639-648
- Gomez-Zurita J., Vogler A.P. 2003. Incongruent nuclear and mitochondrial phylogeographic patterns in the *Timarcha goettingensis* species complex (Coleoptera, Chrysomelidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 16: 833–843
- Hames D. B., Hooper N. M. 2006. *Biochemistry*. New York, Taylor and Francis; 438 strani
- Hänfling B., Douerelo-Soler I., Knight L.R.F.D. & Proudlove G.S. 2009. Molecular studies on the *Niphargus kochianus* group (Crustacea: Amphipoda: Niphargidae) in Great Britain and Ireland. *Cave and Karst Science*, 35: 35-40
- Heled J., Drummond J.A. 2010. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 570-580
- Hewitt G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical transactions of the royal society of London. Series B, Biological Sciences*, 359: 183-195
- Hogg, I.D., Stevens, M.I., Schnabel, K.E., Chapman, M.A. 2006. Deeply divergent lineages of the widespread New Zealand amphipod *Paracalliope xuviatilis* revealed using allozyme and mitochondrial DNA analyses. *Freshwater Biology*, 51: 236–248
- Holsinger, J. R. (2000). Ecological derivation, colonization, and speciation. V: *Subterranean Ecosystems*. Wilkins H., Culver D.C., Humphreys W.F. (Ur.) Amsterdam, Elsevier: 399-415
- Holsinger, J. R. 1980. *Stygobromus canadensis*, a new subterranean amphipod crustacean (Crangonyctidae) from Canada, with remarks on Wisconsin refugia. *Canadian Journal of Zoology*, 58, 2: 90-97
- Hüppop, K. 2000. How do cave animals cope with the food scarcity in caves? V: *Subterranean ecosystems*. Wilkens H., Culver D.C., Humphreys W.F. (Ur.). Amsterdam, Elsevier: 159-188

- Issartel J., Renault D., Voituren Y., Bouchereau A., Vernon P., Hervant F. 2005. Metabolic responses to cold in subterranean crustaceans. *Journal of Experimental Biology*, 208: 2923-2929
- Issartel J., Voituren Y., Odagescu V., Baudot A., Guillot G., Ruaud J. P., Renault D., Vernon P., Hervant F. 2006. Freezing or supercooling: how does an aquatic subterranean crustacean survive exposures at subzero temperatures? *The Journal of Experimental Biology*, 209: 3469-3475
- Jacobsen D., Dangles O. 2011. Environmental harshness and global richness patterns in glacier-fed streams. *Global Ecology and Biogeography*, 21,6: 647-656
- Jacobsen F., Friedman N.R., Omland K.E. 2010. Congruence between nuclear and mitochondrial DNA: Combination of multiple nuclear introns resolves a well-supported phylogeny of New World orioles (*Icterus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56: 419-427
- Jakopin S. 1976. Primerjava nekaterih populacij vrste *Niphargus stygius* (Schiodte) (Amphipoda, Gammaridae). Diplomsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 30 strani
- Jazdzewski K., Kupryjanowicz J. 2010. One more fossil *Niphargus* (Malacostraca: Amphipoda) from Baltic Amber. *Journal of Crustacean Biology*, 30, 3: 413-416
- Karaman G.S. 1986. First discovery of genus *Niphargus* Sch. in Iraq, Israel and adjacent regions, with description of *N. itus*, new species (fam. Niphargidae) (Contribution to the knowledge of the Amphipoda 153). *Poljepriveda i šumarstvo*, 32: 13-36
- Karaman G.S. 1998. First discovery of the family Niphargidae (Gammaridea) in Iran. *The Montenegrin Academy of Sciences and Arts: Glasnik of the Section of Natural Sciences*, 12: 9-22
- Karaman G.S., Ruffo S. 1986. Amphipoda: *Niphargus* - group (Niphargidae sensu Bousfield, 1982). V: *Stygofauna Mundi*. Botosaneanu L. (ur.). Amsterdam, Leiden: 514-534
- Karaman S. 1952. Podrod *Stygoniphargus* u Sloveniji i Hrvatskoj. Poseban otisak iz 25. knjige *Prirodoslovnih istraživanja*, *Academia Scientiarum et Artium Slavorum Meridionalium* 1: 5-38
- Kingman J.F.C. 1982. The Coalescent. *Stochastic Processes and their Applications*, 13: 235-248
- Kornobis E., Palsson S., Kristjansson B., Svavarsson J. 2010. Molecular evidence of the survival of subterranean amphipods (Arthropoda) during ice Age underneath glaciers in Iceland. *Molecular Ecology*, 19,12: 2516-2530

- Kornobis E., Pálsson S., Sidorov D. 2011. Molecular taxonomy and phylogenetic affinities of two groundwater amphipods, *Crangonyx islandicus* and *Crymostygius thingvallensis*, endemic to Iceland. *Molecular phylogenetics and evolution*, 58, 3: 527-39
- Kubatko L.S., Degnan J.H. 2007. Inconsistency of Phylogenetic Estimates from Concatenated Data under Coalescence. *Society of Systematic Biologist*, 56,1: 17-24
- Kunaver J., 1975. On the geomorphological development of the Basin of Bovec during the Pleistocene epoch. *Geografski Vestnik*, 47: 11–39
- Kuščer D., Grad K., Nosan A., Ogorelec B. 1974. Geološke raziskave soške doline med Bovcem in Kobaridom. *Geologija*, 17: 425–476
- Leaché A.D. 2010. Species trees for spiny lizards (Genus *Sceloporus*): Identifying points of concordance and conflict between nuclear and mitochondrial data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 162-171
- Léfebure T., Douady C.J., Gouy M., Gibert J. 2006b. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular treshold to help species delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 435-447
- Léfebure T., Douady C.J., Gouy M., Trontelj P., Briolay J., Gibert J. 2006a. Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments. *Molecular Ecology*, 15: 1797-1806
- Léfebure T., Douady C.J., Malard F., Gibert J. 2007. Testing dispersal and cryptic diversity and dynamic in a widely distributed groundwater amphipod (*Niphargus rhenorodanensis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 676-686
- Malard F., Hervant F. 1999. Oxygen supply and the adaptations of animals in groundwater. *Freshwater Biology*, 41: 1-30
- Mezek T., Simčič T., Arts M.T., Brancelj A. 2010. Effect of fasting on hypogean (*Niphargus stygius*) and epigean (*Gammarus fossarum*) amphipods: a laboratory study. *Aquatic Ecology*, 44: 397-408
- Mori N., Brancelj A. 2011. Invertebrate drift during in-stream gravel extraction in the River Bača, Slovenia. *Fundamentals of applied limnology*, 178, 2: 121-130
- Müller J. 2000. Mitochondrial DNA variation and the evolutionary history of cryptic *Gammarus fossarum* types. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 15: 260–268
- Near T.J., Bolnick D.I., Wainwright P.C. 2004. Investigating phylogenetic relationships of sunfishes and black basses (Actinopterygii: Centrarchidae) using DNA sequences from mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 344–357
- Palumbi S.R. 1996. The polymerase chain reaction. V: *Molecular systematics*, 2nd edition. D.M. Hillis, C. Moritz, B. K. Marble (eds). Sinauer, Sunderland, Massachusetts: 205-247

- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253-1256
- Proudlove G.S., Wood P.J., Harding P.T., Horne D.J., Knight L.R.F.D. 2003. A review of the status and distribution of the subterranean aquatic Crustacea of Britain and Ireland. *Cave and Karst science*, 30: 53-74
- Provan J., Bennett K.D. 2008. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 23, 10: 564-571
- Rambaut A. 2006. FigTree v 1.3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Rokas A., Williams B.L., King N., Carroll S.B. 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature*, 425: 798-804
- Ronquist F. and Huelsenbeck J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19:1572-1574
- Rosenberg N.A., Nordborg M. 2002. Genealogical Trees, Coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Review Genetics*, 3, 5: 380-390
- Schmidt J. 2001. Slovar grške in rimske mitologije [Dictionnaire de la mythologie grecque et romaine]. Prevedla Veronika Simoniti. Ljubljana: Mladinska knjiga. 243 str.
- Simčič T. in Brančelj A. 2007. The effect of light on oxygen consumption in two amphipod crustaceans-the hypogean *Niphargus stygius* and the epigeal *Gammarus fossarum*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 40, 2: 141-150
- Simon C., Frati., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651-701
- Sket B. 1974: *Niphargus stygius* (Schiodte) (Amphipoda, Gammaridae)-die Neubeschreibung des Renerotypus, Variabilität, Verbreitung und Biologie der Art. *Biološki Vestnik*, 22, 1: 91-103
- Sket B. 1999a. High biodiversity in hypogean waters and its endangerment – the situation in Slovenia, the Dinaric karst and Europe. *Crustaceana*, 72: 767-779
- Sket B. 1999b. The nature of biodiversity in hypogean waters and how it is endangered. *Biodiversity and conservation*, 8: 1319-1338
- Sota T., Vogler A.P. 2001. Incongruence of Mitochondrial and Nuclear Gene Trees in the Carabid Beetles *Ohomopterus*. *Systematic Biology*, 50, 1: 39–59
- Spinks P.Q., Shaffer B. 2009. Conflicting Mitochondrial and Nuclear Phylogenies for the Widely Disjunct Emys (Testudines: Emydidae) Species Complex, and What They Tell Us about Biogeography and Hybridization. *Systematic Biology*, 58, 1: 1–20

- Stoch F. 1995. The ecological and historical determinants of crustacean diversity in groundwaters, or: why are there so many species?. *Mémoires de Biospéologie*, 22: 139-160
- Stoch F., Galassi D.M.P. 2010. Stygobiotic crustacean species richness: a question of numbers, a matter of scale. *Hydrobiologia*, 653: 217-234
- Strecker U., Bernatchez L., Wilkens H. 2003. Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular Ecology*, 12: 699–710
- Šifrer M. 1961. Porečje Kamniške Bistrice v pleistocenu. Dela IV. razreda. SAZU: 12, 112 strani
- Šifrer, M. 1992. Geomorfološki razvoj Blejsko-radovljiške ravnine in Dobrav v kvartarju, Radovljiški zbornik: 6–14
- Šikić D., Pleničar M. 1975. Tumač za list Ilirska Bistrica Osnovne geološke karte SFRJ 1: 100.000. Zvezni geološki zavod, Beograd
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739
- Ting N., Tosi A.J., Li Y., Zhang Y., Disotell T.R. 2008. Phylogenetic incongruence between nuclear and mitochondrial markers in the Asian colobines and the evolution of the langurs and leaf monkeys. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 466–474
- Trontelj P., Douady C.J., Fišer C., Gibert J., Gorički Š., Lefébure T., Sket B., Zakšek V. 2009. A molecular test for cryptic diversity in groundwater: how large are the ranges of macro-stygobionts? *Freshwater Biology* 54: 727-744
- Uhan, J., Bat, M. 2003. Vodno bogastvo Slovenije. Agencija RS za okolje, Ljubljana. 131 str.
- Väinölä R., Witt J.D.S., Grabowski M., Bradbury J.H., Jadzewski K., Sket B. 2008. Global diversity of amphipods (Amphipoda ; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 241-255
- Vandergast A. G., Bohonak A.J., Weissman D.B., Fisher R.N. 2007. Understanding the genetic effects of recent habitat fragmentation in the context of evolutionary history: phylogeography and landscape genetics of a southern California endemic Jerusalem cricket (Orthoptera: Stenopelmatidae: *Stenopelmatus*). *Molecular Ecology*, 16: 977-992
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990 Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: PCR Protocols. Innis M.A., Gelfand G.H., Sninsky J.J., White T.J. (ur.). San Diego, Academic Press: 315–332

- Wiens, J.J., 1998. Combining data sets with different phylogenetic histories. *Systematic Biology*, 47: 568–581
- Williams, D., Dunkerley, D., DeDecker, P., Kershaw, P. & Chappell, M. 1998 Quaternary environments. London: Arnold
- Witt J.D.S., Hebert P.D.N. 2000. Cryptic species diversity and evolution in the amphipod genus *Hyallega* within the central glaciated North America: a molecular phylogenetic approach. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57: 687–698
- Xia, X., and Xie. Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92: 371-373
- Zagmajster M. 2007. Analiza razširjenosti izbranih skupin troglobijske favne na Dinarskem območju. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 128 strani
- Zakšek V., Sket B., Gottstein S., Franjević D., Trontelj P. 2009. The limits of cryptic diversity in groundwater: phylogeography of the cave shrimp *Troglocaris anophthalmus* (Crustacea: Decapoda: Atyidae). *Molecular Ecology*, 18: 931–946
- Zakšek V., Sket B., Trontelj P. 2007. Phylogeny of the cave shrimp *Troglocaris*: Evidence of a young connection between Balkans and Caucasus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 223–235
- Žlebnič L. 1971. Pleistocene deposits of the Kranj, Sora and Ljubljana fields. *Geologija*, 14: 5-51

7.2. DRUGI VIRI

- Fišer C. 2012. »Fotofobija postranic rodu *Niphargus*«. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani (Osebni vir, junij 2012)
- Zakšek V. 2012. »Oligonukleotidni začetniki« Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani (Osebni vir, junij 2012)

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojim mentorjema, Cenetu Fišerju in Valeriji Zakšek, ki sta svoje navdušenje nad postranicami in genetiko prenesla tudi name ter me vpeljala in pripeljala skozi Scilo in Karibdo izdelave diplomske naloge.

Iskrena hvala Petru Trontlju, ki je s svojimi komentarji in razmišljanji pognal stvari naprej, ko so nekoliko zastale. Hkrati se mu zahvaljujem za hiter odziv pri recenziji, pomoč in kritičnost pri razlagi rezultatov.

Hvala Meti za nesebično pomoč in sodelovanje pri vseh laboratorijskih »radostih«. Hvala Ajdi za začetno uvajanje ter Žigatu za laboratorijske pogovore.

Velika hvala profesorju Sketu za pisne prošnje, ki so mi omogočile dostop do nekaterih jam, ter za določitev nabranih osebkov postranic v času mentorjeve odsotnosti.

Hvala Gregorju (Branimiru) Bračku za tehnično in glasbeno podporo. Oprosti za uporabo tvojega računalnika brez vprašanja.

Hvala članom DZRJ Ljubljana za četkove sestanke, vikend akcije in še trajajočo šolo. Matija, hvala ker si se vedno odzval na moja vabila v jame. Ravno tako se moram zahvaliti Janji, ki se je vedno brez pomisleka odpravila z menoj v podzemlje. Hvala Primožu za nabrane vzorce.

Hvala mojim sošolcem in prijateljem: Denisu, Martinu, Klari, Šimetu, Luciji..., ki so se vedno izkazali kot zelo dobri »distraktorji«.

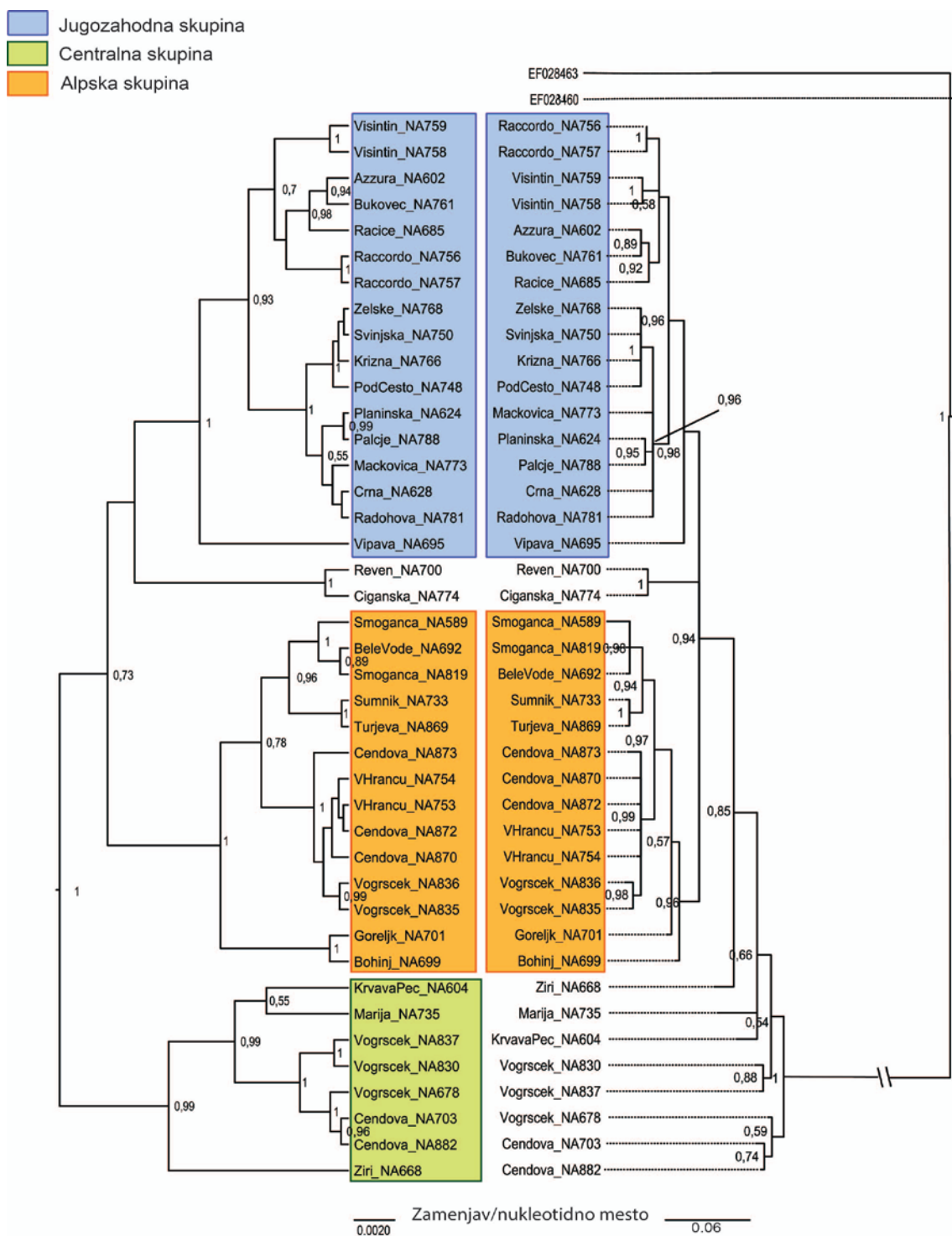
Posebna hvala Maji za spodbudo in toplo besedo v »nikoli ne bom diplomiral« trenutkih, tečaj uporabe GIS orodij, konstruktivne kritike, skupaj spite in predebatirane kave ter pomoč pri nabiranju živali.

Za konec hvala setri Katji in staršema za njihovo strpnost, saj sem jim in jim še vedno zadajam veliko preglavic. Hvalo za vašo večno pomoč in občasne »brce v rit«.

PRILOGA A

Drvo mitohondrijskih 16S rRNA zaporedij *Niphargus stygius* po Bayesovi metodi s programi *BEAST (levo) in MrBayes (desno). Prikazane so posteriorne verjetnosti posameznih cepitev. Dolžine vej so sorazmerne genetskim razdaljami po GTR+G modelu substitucij.

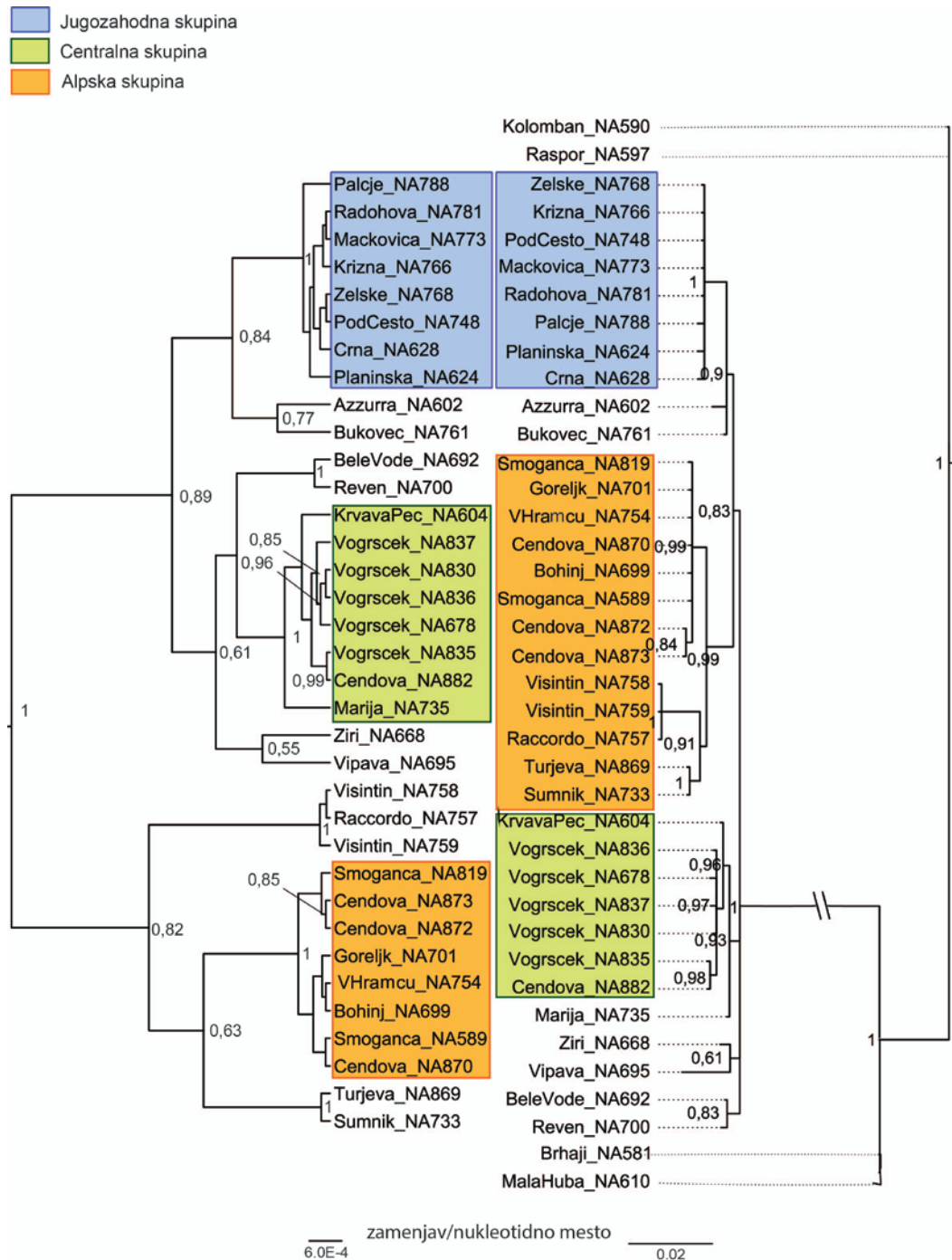
Niphargus stygius 16S rRNA gene tree calculated with Bayesian inference in *BEAST (left) and MrBayes (right). Posterior probabilities above 0.5 are shown. Branches lengths are relative to number of genetic distances by GTR+G substitution model.



PRILOGA B

Drevo mitohondrijskih ITS zaporedij *Niphargus stygius* po Bayesovi metodi s programi *BEAST (levo) in MrBayes (desno). Prikazane so posteriorne verjetnosti posameznih cepitev. Dolžine vej so sorazmerne genetskimi razdaljami po GTR+G+I modelu substitucij.

Niphargus stygius ITS gene tree calculated with Bayesian inference in *BEAST (left) and MrBayes (right). Posterior probabilities above 0.5 are shown. Branches lengths are relative to number of genetic distances by GTR+G+I substitution model.

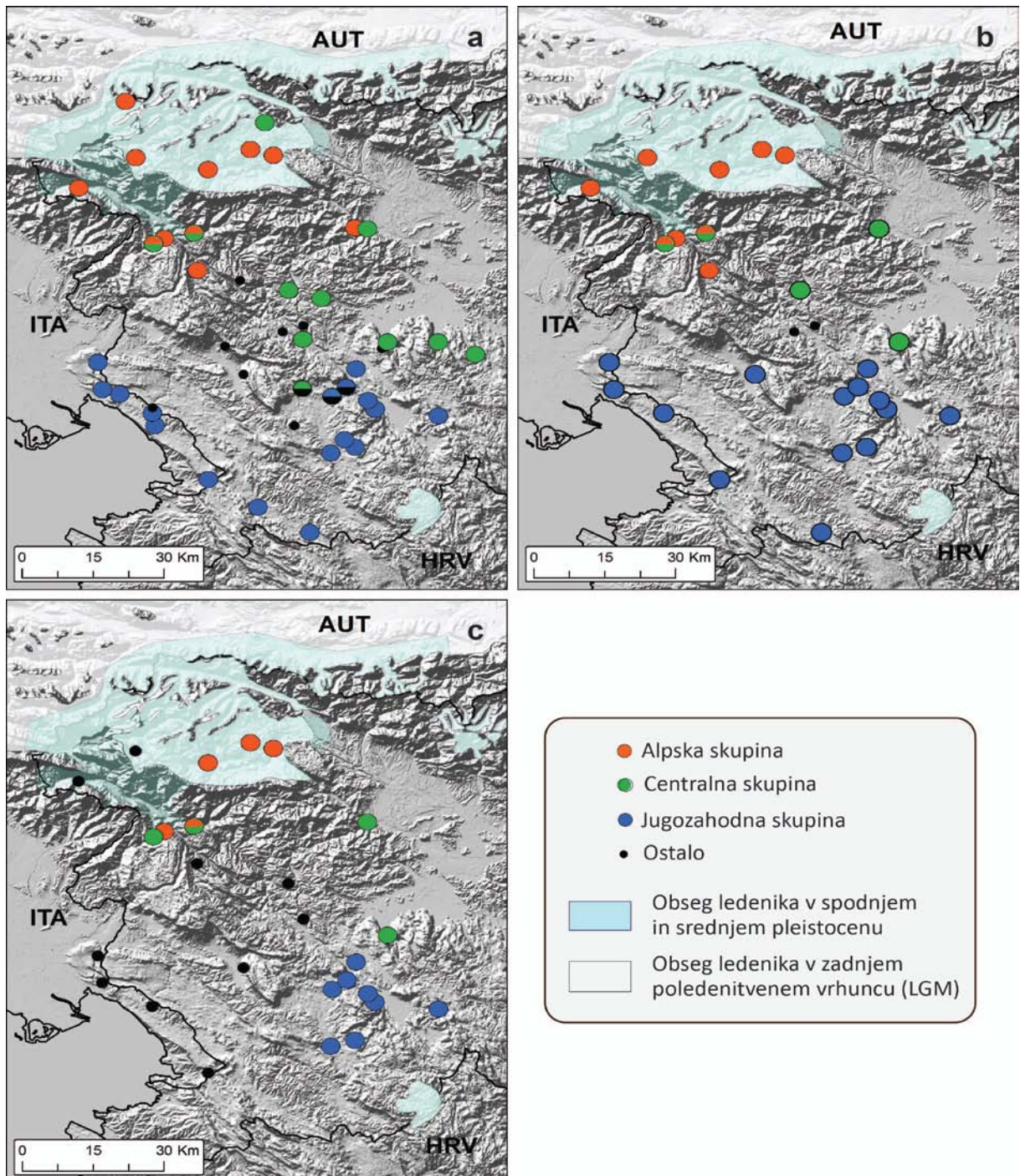


PRILOGA C

Razširjenost filogeografskih skupin *N. stygius* na podlagi filogenetskih dreves izračunanih s programom BEAST na polnem obsegu a) gena za COI, b) gena za 16S rRNA, c) gena za ITS.

Niphargus stygius phylogenetic groups range based on the trees calculated in BEAST for: a) 125 COI gene samples, b) 41 16S rRNA gene samples and c) 42 ITS gene samples.

Niphargus stygius phylogeographic groups range, calculated in *BEAST for: a) 125 COI gene samples, b) 41 16S rRNA gene samples, c) 42 ITS gene samples.



PRILOGA D

Preglednica: Seznam lokalitet molekulsko analiziranih osebkov *Niphargus stygius* sensu lato. Koordinate (X, Y) so podane v Gauss – Kruegerjevem geografskem sistemu. COI, 16s rRNA in ITS označujejo analizirano nukleotidno zaporedje. Znak + pomeni, da je določeno nukleotidno zaporedje bilo vključeno v naše filogenetske analize. Če ni oznake za haplotip, pomeni da analiza ni bila uspešna.

Št.	Lokaliteta	X	Y	Oznaka vzorca	Haplotip	16S		
						COI	rRNA	ITS
1.	4. tunel od Vrha Mangrta, Log pod Mangrtom, Bovec, SLO	144118	394904	NA784	TUR1	+		+
				NA785	TUR1	+		
				NA786				
2.	Bohinjsko jezero (profundalni bentos), Ribčev laz, Bohinjska bistrica, SLO	127688	412354	NA764				
3.	Brezno na grmadi (kat.št. 6289), Brestovica, Komen, SLO	73610	393720	NA629	GRM1	+		
				NA630	GRM1	+		
				NA631				
4.	Bunker med Vižintini in Devetaki, Doberdob, Gorica, ITA	81237	389107	NA758	VIZ2	+	+	+
				NA759	VIZ1	+	+	+
				NA760	VIZ2	+		
5.	Ciganska jama pri Predgrizah (kat.št. 493), Črni vrh, Idrija, SLO	88550	428270	NA718	CIG1	+		
				NA774	CIG1	+	+	
				NA775	CIG1	+		+
				NA776				
6.	Čendova jama (kat.št. 2903), Ponikve, Kneža, SLO	112390	409420	NA703	CEN1		+	
				NA719	CEN2	+		
				NA870	CEN2	+	+	+
				NA871	CEN2	+		
				NA872	CEN2	+	+	+
				NA873	CEN2	+	+	+
				NA874	CEN2	+		
				NA875	CEN2	+		
				NA876	CEN2	+		
				NA877	CEN2	+		
				NA878	CEN1	+		
				NA880	CEN2	+		
NA881	CEN1	+						
NA882	CEN1	+	+	+				
NA883	CEN2	+						
NA884	CEN2	+						
NA879								

"se nadaljuje"

"nadaljevanje...«

Št.	Lokaliteta	X	Y	Oznaka vzorca	Haplotip	COI	16S		
							rRNA	ITS	
7.	Črna jama (kat.št. 471), Postojna, SLO	73120	438750	NA626	CRN2	+		+	
				NA627	CRN1	+			
				NA628	CRN2	+	+	+	
8.	Gabrovška jama, Gabrovec, Trst, ITA	65994	401204	NA644	GAB1	+			
				NA645	GAB1	+			
				NA643					
9.	Goreljek, Poljuka, SLO	132539	421345	NA701	GOR1	+	+	+	
				NA716	GOR1	+			
10.	Grotta Azzurra di Samatorza, Samatorza, Opicina, ITA	69012	400608	NA601	AZZ1	+			
				NA602	AZZ1	+	+	+	
				NA603	AZZ1	+			
11.	Grotta del Raccordo, Monfalcone, ITA	74684	390074	NA755	RAC1	+			
				NA756	RAC2	+	+		
				NA757	RAC1	+	+	+	
12.	Hudournik (kat.št. 528), Turjak, Ljubljana, SLO	83120	468950	NA725	HUD1	+			
13.	Izvir Mrzlek, Radovna, Bled, SLO	139024	424396	NA694	CEN1	+			
14.	Izvir pri domačiji Kenda, Gorenja Kanomlja, Idrija, SLO	100980	419182	NA586	KEN1	+			
15.	Izvir Vipave, Vipava, SLO	78336	419932	NA695	VIP1	+	+	+	
16.	Izvirček pod izvirom Timava, Štivan, Monfalcone, ITA	72405	390791	NA727					
				NA728					
17.	Jama Bele vode (kat.št. 2966), Gorenja Trebuša, Tolmin, SLO	103435	410130	NA692	BEL1	+	+	+	
18.	Jama pod cesto (kat.št. 1008), Dolenja vas, Cerknica, SLO	69990	447680	NA748	CES1	+	+	+	
19.	Jama pod gradom pri Osojnici (kat.št. 813), Osojnica, Žiri, SLO	98600	429480	NA640	ZIR3	+			
				NA641	ZIR1	+			
				NA642	ZIR2	+			
				NA668	ZIR3	+	+	+	
				NA669	ZIR1	+			
				NA670	ZIR1	+			
20.	Jama pod Smoganico (kat.št. 823), Lom, Most na Soči, SLO	111070	403100	NA589	SMO2	+	+	+	
				NA819	SMO2	+	+	+	
				NA820	SMO2	+			
				NA821	SMO2	+			
				NA822	SMO1	+			
				NA823	SMO2	+			
				NA824	SMO2	+			
				NA825	SMO2	+			
				NA583					"se nadaljuje"

"nadaljevanje..."

Št.	Lokaliteta	X	Y	Oznaka vzorca	Haplotip	16S		
						COI	rRNA	ITS
				NA690				
21.	Jama pri Sv. Treh Kraljih (kat.št. 541), Vrh, Vrhnika, SLO	96640	436350	NA632	KRA1	+		
				NA633	KRA1	+		
				NA634	KRA1	+		
22.	Jamovka (kat.št. 107), Borovnica, Vrhnika, SLO	84550	449250	NA720	JAM1	+		
	Jelenska jama (kat.št. 26), Borovnica, Vrhnika SLO	86174	450377	NA637	JEL1	+		
				NA638	JEL1	+		
				NA639	JEL1	+		
24.	Kevderc (kat.št. 370), Krvava peč, Rob, SLO	86174	450377	NA604	KEV1	+	+	+
				NA605				
				NA606				
25.	Kevderca na Lubniku (kat.št. 3), Sopotnica, Škofja Loka, SLO	113656	443482	NA721	LUB1	+		
				NA722	LUB1	+		
				NA723	LUB1	+		
26.	Konasnica (kat.št. 1241), Dražgoše, Radovljica, SLO	125200	433630	NA765				
27.	Križna jama (kat.št. 65), Bločice, Lož, SLO	68357	461103	F02				+
				J04				+
				NA766	KRI1	+	+	+
28.	Mačkovica (kat.št. 52), Laze, Logatec, SLO	79670	443737	NA772	MAC1	+		
				NA773	RAD1	+	+	+
				NA771				
29.	Marijino brezno (kat.št. 6), Škofja Loka, Škofja Loka, SLO	113390	446095	NA734	MAR1	+		
				NA735	MAR2	+	+	+
30.	Markov spodmol (kat.št. 878), Rakulik, Postojna, SLO	65990	430730	NA671	MARK2	+		
				NA672	MARK1	+		
				NA673	MARK2	+		
31.	Medvedjak (kat.št. 881), Markovščina, Kozina, SLO	46366	422912	NA682	MED1	+		
				NA683				
32.	Pajsarjeva jama (kat.št. 115), Vrhnika, SLO	95091	443497	NA697				
33.	Planina v Hramcu (izvir), Gorjuše, Pokljuka, SLO	131120	426238	NA752	HRA1	+		
				NA753	HRA2	+	+	
				NA754	HRA2	+	+	+
34.	Planinska jama (kat.št 748), Planina, Rakek, SLO	5075350	5441770	NA623	PLA2	+		
				NA624	PLA1	+	+	+
				NA625	PLA2	+		
				NA730	PLA1	+		
				NA724				

"se nadaljuje"

"nadaljevanje..."

Št.	Lokaliteta	X	Y	Oznaka vzorca	Haplotip	16S		
						COI	rRNA	ITS
35.	Podtaborska jama (kat.št. 95), Podtabor, Žužemberk, SLO	70192	482334	NA691				
36.	Potok Šumnik pri izlivu v Lepeno, Lepena, Bovec, SLO	130522	397096	NA688	TUR1	+		
				NA732	TUR1	+		
				NA733	TUR1	+	+	+
				NA687				
				NA689				
37.	Predjamski jamski sistem (kat.št. 734), Predjama, Postojna, SLO	5074960	5432510	NA646	PRE2	+		
				NA647	PRE2	+		
				NA648	PRE1	+		
38.	Račiška pečina (kat.št. 942), Račice, Ilirska Bistrica, SLO	40247	433967	NA685	RAC1	+	+	
				NA686	RAC1	+		
39.	Rauhova jama (kat.št. 3161), Črmošnjice, Črnomelj, SLO	508600	56540	NA680 NA681				
40.	Revenov brezen (kat.št. 1761), Hotederščica, Godovič, SLO	90050	432690	NA700	REV1	+	+	+
41.	Ribogojnica ob Bohinjskem jezeru(izviru), Ribčev Laz, Bohinjska Bistrica, SLO	127688	412354	NA699	GOR1	+	+	+
				NA778	GOR1	+		+
				NA779	GOR1	+		
				NA777				
42.	Izvir Bukovec, Trieste, ITA	52988	412473	NA761	BUK2	+	+	+
				NA762	BUK1	+		
				NA763				
43.	Izvir nad ruševinami cerkve sv. Marjeta, Palčje, Pivka, SLO	60792	443480	NA788 NA787	PAL1	+	+	+
44.	Slugova jama (kat.št. 1055), Golobinjek, Dol. toplice, SLO	77447	504369	NA693 NA702				
45.	Svinjska jama (kat.št. 534), Dolenja vas, Cerknica, SLO	69950	447780	NA750	SVI1	+	+	
				NA751	SVI2	+		
46.	Tikina jama (kat.št. 8837), Podgrad, Ilirska bistrica, SLO	39351	433439	NA714				
				NA715				
				NA770				
47.	Tomažinov brezen (kat.št. 266), Novi svet, Dol. Logatec, SLO	86790	432499	NA696	TOM1	+		
48.	Trnska jama (kat.št. 739), Trnje, Postojna, SLO	62625	441325	NA736	TRN1	+		
				NA737				
49.	Turjeva jama (kat.št. 821), Kred, Tolmin, SLO	123233	385050	NA869	TUR1	+	+	+
50.	Velika jama nad Trebnjem (kat.št. 104), Trebnje, SLO	83980	501020	NA674				
				NA675				
				NA676				

"se nadaljuje"

"nadaljevanje... "

Št.	Lokaliteta	X	Y	Oznaka vzorca	Haplotip	COI	16S	
							rRNA	ITS
51.	Velika pasica (kat.št. 75), Rakitna, Ljubljana, SLO	86180	461052	NA783	PAS1	+		
				NA782				
52.	Veliki Hubelj, rov ob odtoku za vojašnico, Vipava, SLO	85113	416051	NA731	HUB1	+		
				NA684	HUB2	+		
53.	Vodnica (kat.št. 947), Brje pri Komnu, Komen, SLO	70365	400765	NA698	VOD1	+		
54.	Vodnjak Ivana Dekleve, Pod Primožem 3, Pivka, SLO	59380	438324	NA781	RAD1	+	+	+
				NA780				
55.	Vogršček (kat.št. 3903), Avče, Tolmin, SLO	109825	400860	NA677	CEN2	+		
				NA678	VOG2	+	+	+
				NA679	CEN1	+		
				NA726	CEN2	+		
				NA828	CEN2	+		
				NA830	VOG1	+	+	+
				NA831	CEN2	+		
				NA833	VOG2	+		
				NA834	CEN2	+		
				NA835	CEN2	+	+	+
				NA836	CEN2	+	+	+
				NA837	TOM1	+	+	+
				NA729				
NA826								
NA827								
NA829								
NA832								
56.	Zelške jame (kat.št. 576), Zelše, Cerknica, SLO	72060	446220	NA768	ZEL2	+	+	+
				NA769	ZEL1	+		

PRILOGA E

Preglednica: 28 testiranih oligonukleotidnih začetnikov. Poudarjeni so tisti, vključeni v nadaljne analize.

št.	Oligonukleotidni začetnik	Originalni vir	Vezavno mesto
1.	1400 F	Elwood in sod. 1985	18S rDNA
2.	12S lev	Fišer in sod. 2008	12S rRNA
3.	12S des1	Fišer in sod. 2008	12S rRNA
4.	28S lev2	Fišer in sod. 2008	28S rRNA
5.	28S lev3	Fišer in sod. 2012	28S rRNA
6.	28S des5	Fišer in sod. 2012	28S rRNA
7.	ITS F1	Flot in sod. 2010	ITS
8.	ITS R1	Flot in sod. 2010	ITS
9.	ITS SF1	Flot in sod. 2010	ITS
10.	ITS SR1	Flot in sod. 2010	ITS
11.	ITS SF2	Flot in sod. 2010	ITS
12.	ITS SR2	Flot in sod. 2010	ITS
13.	LCO 1490	Folmer in sod. 1994	COI
14.	HCO 2198	Folmer in sod. 1994	COI
15.	F - 77	Lefébure in sod. 2006	16S rRNA
16.	R - 1000	Lefébure in sod. 2006	16S rRNA
17.	28S des3	V. Zakšek (osebni vir)	28S rRNA
18.	ITSVIII	Palumbi 1996	5.8 rDNA
19.	ITSIII	Palumbi 1996	18S rDNA
20.	ITS IX	Palumbi 1996	28S rRNA
21.	Jerry	Simon in sod. 1994	COI
22.	Maggie	Simon in sod. 1994	COI
23.	ITS1	White in sod. 1990	18S rDNA
24.	ITS2	White in sod. 1990	5.8 rDNA
25.	ITS3	White in sod. 1990	5.8 rDNA
26.	ITS4	White in sod. 1990	28S rRNA
27.	28S des2	Zakšek in sod. 2007	28S rRNA
28.	ITSVIII rev	Zakšek in sod. 2009	5.8 rDNA