

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Klemen ČANDEK

**UPORABA ČRTNIH KOD DNA V TAKSONOMIJI IN
BIOGEOGRAFIJI PAJKOV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Klemen ČANDEK

**UPORABA ČRTNIH KOD DNA V TAKSONOMIJI IN
BIOGEOGRAFIJI PAJKOV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**UTILITY OF DNA BARCODES IN TAXONOMY AND
BIOGEOGRAPHY OF SPIDERS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek magistrskega študija Strukturne in funkcionalne biologije. Opravljeno je bilo na Biološkem inštitutu Jovana Hadžija, ZRC SAZU v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za biologijo, BF, je dne 6. 2. 2013 sprejela temo in za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Matjaža Kuntnerja, za recenzenta pa doc. dr. Ceneta Fišerja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Matjaž KUNTNER
ZRC SAZU, Biološki inštitut Jovana Hadžija

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

Datum zagovora: 9. 9. 2013

Diplomsko delo 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.

Klemen Čandek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	565.4:303.722.4:565.4(043.3)=163.6
KG	črtne kode DNA/taksonomija/morfologija/biogeografija/filogenija/pajki
AV	ČANDEK, Klemen, diplomirani biolog (UN)
SA	KUNTNER, Matjaž (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek biologijo
LI	2013
IN	UPORABA ČRTNIH KOD DNA V TAKSONOMIJI IN BIOGEOGRAFIJI PAJKOV
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	X, 84 str., 3 pregl., 4 sl., 6 pril., 135 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	

Na zemlji živi približno 1,5 milijona znanih vrst, številne pa so še neodkrite, zato ima taksonomija pomembno nalogo. Poleg morfoloških podatkov taksonomija uporablja tudi vse več molekularnih podatkov in tehnik. Ena takih tehnik je identifikacija vrst s črtnimi kodami DNA (ČKD). ČKD je približno 650 nukleotidov (nt) dolg del gena CO1. V tej nalogi je analizirana njihova uporabnost, s pajki kot testnimi organizmi. Vzorceni so bili v Sloveniji in Švici, identificiranih je bilo 324 vrst. Po identifikaciji je bil material procesiran za izolacijo DNK, PCR in urejanje pridobljenih 444 sekvenc ČKD. Za zanesljivost ČKD pri identifikaciji je pomemben obstoj t. i. vrzeli med ČKD, katere prisotnost testira ta naloga. Analizira tudi variabilnost ČKD glede na visoko oz. nizko značilnost morfoloških znakov vrst. Naloga preverja odnos variabilnosti ČKD s širšim oz. ožjim geografskim območjem vzorčenja vrst, opravljena pa je tudi filogenetska analiza z programom MrBayes. Rezultati so potrdili obstoj vrzeli med ČKD, prikazali pa niso nobenih razlik v variabilnosti ČKD glede na morfološke značilnosti vrst. Rezultati na področju biogeografije kažejo na enako zanesljivo identifikacijo vrst, ne glede na njeno geografsko razširjenost. Pri filogeniji se je po pričakovanjih pojavilo veliko nerazrešenih evolucijskih odnosov. Glavni sklep naloge je: ČKD so uporabne za identifikacijo vrst pajkov, manj pa za biogeografske in filogenetske študije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC 565.4:303.722.4:565.4(043.3)=163.6
CX DNA barcodes/taxonomy/morphology/biogeography/phylogeny/spiders
AU ČANDEK Klemen
AA KUNTNER Matjaž (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of biology
PY 2013
TI UTILITY OF DNA BARCODES IN TAXONOMY AND
BIOGEOGRAPHY OF SPIDERS
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO X, 84 p., 3 tab., 4 fig., 6 ann., 135 ref.
LA SI
AL sl/en
AB

The facts that current global biodiversity is around 1,5 million species but there are many as yet undiscovered species, put taxonomy in front of an important mission. In addition to traditional morphological data, taxonomy increasingly uses molecular data and techniques, among them DNA barcoding. DNA barcode is a 650 nt long segment of the CO1 gene. In this thesis the utility of DNA barcodes in spiders was tested. Spiders were collected in Slovenia and Switzerland for a total number of 324 species. After identification the material was processed for DNA isolation, PCR and sequences editing, and a total of 444 DNA barcodes were obtained. This thesis tests the existence the 'barcoding gap', important for reliable species identification. It also analyses the relation of DNA barcode variability with high or low morphological distinctiveness of species and with narrow vs. wide geographical area of sampled species. Additionally, phylogenetic relations were reconstructed for all taxa using MrBayes. The results confirmed the existence of the DNA barcoding gap, but there were no differences in morphological analysis. The results of the biogeographic test point to reliable species identification regardless of species geographic distribution. As expected, the phylogeny reconstruction showed only limited success with a lot of unresolved relations. The main conclusions are that DNA barcodes are useful for species identification but less so for biogeographic and phylogenetic research.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
SLOVARČEK	X
1 UVOD	1
1.1 ZGODOVINA IN SPLOŠNI PREGLED ČRTNIH KOD DNA	1
1.2 KRITIKA UPORABE ČRTNIH KOD DNA	4
1.3 VRZEL MED ČRTNIMI KODAMI DNA	5
1.4 ČRTNE KODE DNA IN MORFOLOGIJA	6
1.5 ČRTNE KODE DNA IN BIOGEOGRAFIJA	7
1.6 ČRTNE KODE DNA IN FILOGENIJA	9
1.7 ČRTNE KODE DNA IN PAJKI	10
1.8 TRAJNO OHRANJANJE BIODIVERZITETE IN FAVNISTIČNI PRISPEVEK NALOGE	11
1.9 CILJI NALOGE	12
2 METODE	13
2.1 TERENSKO DELO IN IDENTIFIKACIJA	13
2.2 IZOLACIJA DNK IN PCR	14
2.3 ANALIZA ČRTNIH KOD DNA	15
2.4 PODATKI IN STATISTIČNA OBDELAVA	15
2.4.1 Vrzel med črtnimi kodami DNA	16
2.4.2 Značilnost morfoloških znakov in variabilnost črtnih kod DNA	16
2.4.3 Geografsko območje vzorčenja in variabilnost črtnih kod DNA	17

2.4.4	Filogenija z uporabo črtnih kod DNA	18
3	REZULTATI IN RAZPRAVA	18
3.1	VRZEL MED ČRTNIMI KODAMI DNA	18
3.2	ZNAČILNOST MORFOLOŠKIH ZNAKOV IN VARIABILNOST ČRTNIH KOD DNA.....	21
3.3	GEOGRAFSKO OBMOČJE VZORČENJA IN ČRTNE KODE DNA	23
3.4	FILOGENIJA Z UPORABO ČRTNIH KOD DNA.....	26
4	SKLEPI	26
5	POVZETEK	27
6	VIRI	30

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Opisna statistika podatkov uporabljenih za testiranje obstoja vrzeli med črtnimi kodami DNA	18
Preglednica 2: Opisna statistika podatkov uporabljenih za analizo odnosa med črtnimi kodami DNA in značilnostjo morfoloških znakov	21
Preglednica 3: Opisna statistika podatkov uporabljenih za analizo vpliva velikosti geografskega območja vzorčenja na variabilnost črtnih kod DNA	23

KAZALO SLIK

Slika 1: Primerjava medvrstnih in znotrajvrstnih povprečnih K2P genetskih razdalj	19
Slika 2: Drug prikaz primerjave medvrstnih in znotrajvrstnih povprečnih K2P genetskih razdalj	20
Slika 3: Primerjava povprečnih K2P genetskih razdalj skupin rodov, glede na značilnost morfoloških znakov njihovih vrst	22
Slika 4: Primerjava povprečnih znotrajvrstnih genetskih p-razdalj, glede na število kontinentov kjer je bila vrsta vzorčena, torej kjer je znana njena ČKD	24

KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam vrst, kode lokacij vzorčenja ter število odraslih samic ter samcev

Priloga B: Detajlni podatki o lokacijah vzorčenja

Priloga C: Uporabljeni podatki za testiranje obstoja vrzeli med črtnimi kodami DNA

Priloga D: Uporabljeni podatki za analizo odnosa med črtnimi kodami DNA in
značilnostjo morfoloških znakov

Priloga E: Uporabljeni podatki za analizo vpliva velikosti geografskega območja vzorčenja
na variabilnost črtnih kod DNA

Priloga F: Rekonstrukcija filogenetskega drevesa s programom MrBayes

SLOVARČEK

BOLDSYSTEMS	Barcode of Life Data Systems; spletni sistem za delo s črtnimi kodami DNA
CBOL	Consortium for the Barcode of Life
CCDB	The Canadian Centre for DNA Barcoding
CO1/ <i>cox1</i>	gen za podenoto 1 citokrom C oksidaze
ČKD	črtna koda DNA
DNA/DNK	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; deoksiribonukleinska kislina
GGI	Global Genome Initiative
iBOL	International Barcode of Life
K2P	<i>Kimura 2-parameter</i> , Kimurin dvoparametrični model
mtDNA	mitohondrijska DNA
nt	nukleotidi
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , verižna reakcija s polimerazo
RNA/RNK	<i>ribonucleic acid</i> ; ribonukleinska kislina
rRNA	ribosomska RNK
SD	<i>standard deviation</i> ; standardni odklon
tRNA	<i>transfer RNA</i> , prenašalna RNA
ZRC SAZU	Znanstveno raziskovalni center Slovenske akademije znanosti in umetnosti

1 UVOD

1.1 ZGODOVINA IN SPLOŠNI PREGLED ČRTNIH KOD DNA

Na zemlji je trenutno opisanih več kot 1,7 milijona vrst. Zaradi neodkritih sinonimov je verjetno realnejša ocena okoli 1,5 milijona vrst (Costello in sod., 2012). Najbolj grobe ocene vseh vrst se gibljejo celo med 3 in 100 milijoni vrst (May, 2010). Nedavne študije so te številke zožile na okoli 8,7 ($\pm 1,3$) milijona (Mora in sod., 2011) oziroma 5 (± 3) milijonov (Costello in sod., 2013). Sistematska biologija, ki se ukvarja z vrstami živih organizmov, natančneje, z njihovim poimenovanjem in opisom (taksonomija), njihovimi evolucijskimi odnosi (filogenija), njihovo razporeditvijo v okolju (biogeografija) in drugim, ima torej pomembno nalogo.

Taksonomija postavlja temelje za druge veje biologije. Brez nje biologi iz različnih disciplin ne bi mogli objavljati svojih empiričnih podatkov ali dostopati do informacij o tarčnem organizmu, saj ne bi bili prepričani o njihovi identiteti. Taksonomija polaga temelje za konstrukcijo drevesa življenja, ekološke študije ter naravovarstvo (Wilson E. O., 2004). Za začetnika taksonomije in sistema dvojnega poimenovanja vrst smatramo Carla Linnaeusa, z objavo prve izdaje *Systema Naturae* v letu 1753 (Palleroni, 2003), samo besedo taksonomija pa je leta 1813 uvedel Augustin Pyramus de Candolle (Singh, 2012). Tradicionalna taksonomija, ki temelji na preučevanju morfoloških znakov, se sooča z nekaterimi problemi. Zaradi fenotipske plastičnosti nekaterih diagnostičnih znakov lahko pride do napačne identifikacije, morfološko podobne vrste so pogosto spregledane, pri mnogih taksonih pa manjkajo določevalni ključi za identifikacijo neodraslih osebkov oziroma je njihova identifikacija nemogoča. Tradicionalna taksonomija zahteva tudi za specifično skupino izurjenega taksonoma in je številnim biologom nedostopna (Pires in Marinoni, 2010). Le malo dobro izurjenih taksonomov lahko zanesljivo določi le 0,01 odstotek vseh vrst (če vzamemo oceno 10-15 milijonov). Torej bi neprestano potrebovali 15 000 taksonomov, ki bi določali vrste, da bi bila taksonomija, ki temelji izključno na morfologiji, zadostna (Hebert in sod., 2003). Pomoč je prišla z integracijo molekularne biologije v taksonomsko znanost. Napredek v molekularni biologiji v osemdesetih letih dvajsetega stoletja, je prinesel nov nabor orodij, ki je omogočil zaznavo že majhnih razlik

med vrstami ali znotraj vrste na osnovi dednega materiala (Singh, 2012). Danes si je težko predstavljati filogenetske, taksonomske in biogeografske študije brez analize specifičnih genov. Ena od novih metod z visokim potencialom je prav gotovo metoda določanja vrst z črtnimi kodami DNA (Hebert in sod., 2003, 2005).

Črtna koda DNA (ČKD) je kratek del nukletidnega zaporedja določenega gena, običajno mitohondrijskega gena za citokrom C oksidazno, podenoto 1 (CO1 ali *cox1*), dolg približno 650 nukleotidov (nt). Metoda določanja vrst s črtnimi kodami DNA (*DNA barcoding*) je v zadnjem desetletju postala zelo pogosto orodje taksonomov (Wilson J. J., 2011b). Navdih za ime prihaja iz črtnih kod trgovinskih izdelkov, kjer vse izdelke loči unikaten vzorec debelejših in tanjših črt, zato se je P. D. N. Hebertu porodila ideja, zakaj ne bi unikaten vzorec štirih različnih nukleotidov v kratkem segmentu gena deloval na enakem principu (Stoeckle in Hebert, 2008). Izraz ČKD se sicer v pojavi že veliko prej, leta 1993 (Arnot in sod., 1993), koncept identifikacije vrst z uporabo molekularnih orodij pa je še starejši (Kang'ethe in sod., 1982). Določanje s ČKD pa je v zlato dobo vstopilo leta 2003, ko je Hebert s sodelavci predlagal zgoraj omenjeni segment gena CO1 kot najustreznejšega za identifikacijo živalskih vrst s ČKD (Valentini in sod., 2008).

Že v osnovi je mitohondrijski genom živali boljša tarča za analize kot jedrni, predvsem zaradi odsotnosti intronov, manjše stopnje rekombinacije ter haploidnega dedovanja (Saccone in sod., 1999). Pretekla raziskovalna dela so se pogosto osredotočala na mitohondrijska gena za ribosomalno (12s in 16s) RNK, vendar je bila uporaba teh v širši taksonomiji omejena, predvsem zaradi pogostih delecij in insercij ter zelo otežene poravnave DNK (Doyle in Gaut, 2000). Z redkimi izjemami živalski mitohondrijski genom vsebuje enakih 37 genov, dva za rRNK, 13 za proteine ter 22 za tRNK (Boore, 1999). Nabor teh 13 genov, ki kodirajo proteine, je boljša tarča za analize, saj so insercije in delecije pri njih redke. V genih, ki kodirajo proteine, se namreč take mutacije izločajo s selekcijo, saj jih večina vodi v zamaknitev bralnega okvirja (*frame shift*), kar običajno privede do nefunkcionalnega proteina (Watson in sod., 2008). Mitohondrijski geni so zaradi teh lastnosti boljša izbira kot jedrni geni (Hebert in sod., 2003). Nobenega posebnega razloga ni, da bi med prej omenjenimi trinajstimi izbrali specifični gen. Vendar ima CO1 dve pomembni lastnosti, ki ga delata primernejšega. Prvič, univerzalni primerji

ali začetni nukleotidi za ta gen so robustni in ohranjeni skozi evolucijo ter omogočajo obnovitev 5' konca iz predstavnikov večine, če ne celo vseh živalskih debel (Folmer in sod., 1994; Zhang in Hewitt, 1997). Drugič, CO1 ima visoko stopnjo zamenjave tretje baze v kodonu, kar vodi v hitro molekularno evolucijo, ki je dva in pol do trikrat hitrejša kot pri genih za 12S in 16S ribosomalno RNK. Kljub hitri evoluciji pa CO1 vseeno vsebuje največ filogenetske informacije med vsemi mitohondrijskimi geni, ki kodirajo proteine (Knowlton in Weigt 1998; Nicolas in sod., 2012). Evolucija tega gena je tako hitra, da naj bi omogočala ne le razlikovanje med vrstami temveč celo med filogeografskimi skupinami znotraj vrste (Cox in Hebert, 2001; Wares in Cunningham, 2001).

Identifikacija vrst s ČKD je učinkovita za identifikacijo različno starih osebkov, torej tudi morebitnih stadijev, katerih na osnovi morfologije ne moremo identificirati. Omogoča tudi odkrivanje novih vrst (Web in sod., 2012). Potencialna uporaba ČKD pa presega biološke okvirje. Literatura navaja njihovo uporabo tudi v zaščiti potrošnikov pri prevarah v prehranski industriji (Mafra in sod., 2008; Sin in sod., 2013), za forenzične namene pri črnem lovu ter trgovini z ogroženimi vrstami (Dalton in Kotze, 2011; Kumar in sod., 2012; Parveen in sod., 2012; Yan in sod., 2013), oceno kvalitete voda (Sweeney in sod., 2011), v analizi prehrane živali (Clare in sod., 2011) in paleoekologiji (Valentini in sod., 2008). Predpogoj za vse raziskave, ki temeljijo na ČKD, pa je zanesljiva referenčna knjižnica ČKD za posamezne vrste (Web in sod., 2012). Identiteto kateregakoli organizma lahko prepoznamo s primerjavo njegovih s sekvencami v referenčni knjižnici. Hebert je leta 2003 drzno ocenil, da bi lahko v roku dvajsetih let pridobili CO1 sekvence za pet do deset milijonov vrst (Hebert in sod., 2003). Po trenutnih podatkih spletne strani Barcode of Life Data Systems (BOLDSYSTEMS) so ČKD objavljene za 180 503 vrst ter 2 215 682 osebkov (<http://www.boldsystems.org/>; 18. jul. 2013). To je spletna stran z javno dostopnimi podatki oz. neke vrste informacijska delavnica, ki vodi pridobivanje, shranjevanje, analiziranje in objavljanje ČKD. Združuje molekularne, morfološke in geografske podatke (Ratnasingham in Hebert, 2007). Poleg te obstaja še veliko drugih spletnih strani (CBOL, 2013; CCDB, 2013; iBOL, 2013), ki se ukvarjajo s ČKD. Leta 2010 se je začel svetovni projekt pod vodstvom Heberta (iBOL, 2013), katerega glavni namen je razširiti geografsko in taksonomsko pokritost vrst v referenčni knjižnici ČKD. V petih letih nameravajo zbrati ČKD za 5 000 000 osebkov ter 500 000 vrst, kar bo ustvarilo

odlično referenčno knjižnico ČKD, ki bo predstavljala temelje identifikacijskega sistema za ekonomsko, zdravstveno ter naravovarstveno pomembne vrste (iBOL, 2013). Metoda določanja s ČKD je vedno bolj sprejeta predvsem zaradi preprostosti ter relativno ugodne cene (Hebert in sod., 2003; Padial in De La Riva 2007).

1.2 KRITIKA UPORABE ČRTNIH KOD DNA

Znanost temelji na kritičnem preverjanju podatkov in metod. Pri ČKD ni nič drugače. Ne glede na številne prej omenjene pozitivne izkušnje z njimi je kar nekaj raziskovalcev, ki njihovo uporabo zavračajo oziroma pred njihovo uporabo svarijo. Večinoma navajajo razloge, ki jih bomo opisali v nadaljevanju.

Kritiki, kot je Rubinoff in sod. (2006), vidijo težave že pri sami izbiri mitohondrijskega gena. Taka izbira bo zaradi dedovanja po materi zmanjšala efektivno velikost populacije na le eno četrtno v primerjavi z efektivno populacijo pri jedrnih genih. Mitohondrijski geni so zato bolj občutljivi na evolucijska ozka grla ter izolacije (Rubinoff in sod., 2006). Celoten učinek dedovanja po materi na genetsko divergenco v mtDNK ni napovedljiv in čeprav je res, da je večina mitohondrijskega dedovanja v živalskem svetu materinskega, obstajajo izrazite izjeme (Korpelainen, 2004), kar bi pomenilo, da zanemarjamo ves evolucijski proces, ki ni povezan z samicami (Rubinoff in sod., 2006) oziroma smo pristranski do genskega toka pri samcih (Moritz in Cicero, 2004).

Druga težava je heteroplazmija. Heteroplazmija pomeni, da znotraj enega osebka obstaja več mitohondrijskih haplotipov, kar zelo zmanjša uspešnost identifikacije s ČKD, kot poročata Magnacca in Brown (2010).

Problemi mtDNK lahko nastopijo tudi s simbiotskimi mikroorganizmi, ki povzročajo tako imenovano citoplazemsko inkompatibilnost in ubijanje samcev (*male killing*). Ta fenomena lahko porušita pričakovano mitohondrijsko sestavo populacije ali vrste in povzročita napačno interpretacijo rezultatov pri metodah kot je npr. določanje vrst s ČKD. Bakterija *Wolbachia*, na primer, povzroča možne zgoraj naštetе probleme (Johnstone in Hurst, 1996; Hurst in Jiggins, 2005). Ker je 66 % žuželk okuženih s to bakterijo

(Hilgenboecker in sod., 2008) in ker žuželke predstavljajo tri četrtine vseh poznanih vrst, bi bakterija lahko močno omejila uporabnost mtDNK. Vendar novejša študija kaže, da *Wolbachia* ne ogroža identifikacije vrst s ČKD (Smith in sod. 2012).

Nekatere, predvsem nedavno nastale vrste, lahko tvorijo hibride. Hibridizacija vrst lahko pripelje do zelo podobnih ČKD obeh vrst, kar oteži njihovo identifikacijo (Hebert in sod., 2004a; Whitworth in sod., 2007).

Zapleti so možni tudi nad molekularnim nivojem. Meyer in Paulay (2005) navajata, da ČKD ne dosegajo želenih rezultatov, kadar se za identifikacijo uporabljajo pri skupinah, ki so slabo poznane. Hajibabaei in sodelavci (2006b) poročajo, da niso povsem zanesljive pri morfološko zelo podobnih vrstah, Armstrong in Ball (2005) pa opozarjata na težave pri ločevanju ozko sorodnih vrst, kjer priporočata uporabo dodatnega gena. Will in Rubinoff (2004) celo menita, da so ČKD pri določevanju žuželk uporabne samo do nivoja redu, kar se ne splača, saj lahko vsak biolog z osnovami taksonomije zelo hitro določi žuželko do tega nivoja.

Z upoštevanjem kritik in možnih pristranskosti pri rezultatih ter z vedno pogostejšo uporabo ČKD v znanosti bomo verjetno kmalu dobili še zanesljivejše dokaze o uporabnosti te relativno nove molekularne tehnike v taksonomiji. Metoda določanja s ČKD ima prav gotovo visok potencial, ki nam lahko nudi dostop do enciklopedije življenja. Vendar mora biti ta knjiga napisana skupaj z taksonomi, sistematiki, ekologi in drugimi v okviru integrativne taksonomije (Dayrat, 2005; Will in sod., 2005; Cruz-Barraza in sod., 2012).

1.3 VRZEL MED ČRTNIMI KODAMI DNA

Ena glavnih trditev zagovornikov določanja vrst s ČKD je ta, da obstaja tako imenovana vrzel med črtnimi kodami DNA (*barcoding gap*). Ta vrzel se ustvari, če je razlika med povprečno znotrajvrstno ter medvrstno genetsko oddaljenostjo dovolj velika, oz. je povprečna medvrstna razlika vsaj deset krat večja od znotrajvrstne. Računanje genetskih razdalj temelji na Kimurinem dvoparametričnem modelu (K2P) (Kimura, 1980). Ta model je leta 2003 za svojo raziskavo uporabil Hebert (2003), ker naj bi bil najboljši, ko so

razlike v zaporedjih majhne, kasneje pa se je K2P model pogosto uporabljal že zaradi primerljivosti rezultatov različnih raziskav. Določanje s ČKD postane uporabno šele, ko zanesljivo obstaja ta vrzel, saj njen obstoj omogoča zanesljivo uvrstitev večine neznanih organizmov v pravilni takson. (Hebert in sod., 2003, 2004a; Barrett in Hebert, 2005). Obstoj vrzeli med ČKD bi omogočil tudi identifikacijo prej spregledanih in zato ne opisanih vrst (Hebert in sod., 2004a; Smith in sod., 2005, 2006).

Pri identifikaciji s ČKD moramo biti še posebej pozorni na dvoje, na zmotno pozitivne (*false positive*) ter zmotno negativne rezultate (*false negative*). Do prvih pride, če so populacije znotraj vrste genetsko različne, torej pri medsebojno oddaljenih populacijah z omejenim genskim pretokom ali alopatričnih populacijah s prekinjenim genskim pretokom. Neresnični negativni zadetki pa se pojavijo, kadar ne prihaja do variacije v ČKD oziroma je ta zelo majhna med reproduktivno izoliranimi populacijami, ki lahko predstavljajo različne vrste. Slednji so torej še pomembnejši od neresničnih pozitivnih podatkov pri uporabi ČKD za določanje neznanih organizmov (Wiemers in Fiedler, 2007).

Zgodnje študije na pticah (Hebert in sod., 2004a) ter členonožcih (Barrett in Hebert, 2005; Hajibabaei in sod., 2006b) potrjujejo obstoj te vrzeli, vendar pa obstaja kar nekaj študij, ki vrzeli ne potrjujejo, kot na primer raziskave na metuljih (Wiemers in Fiedler, 2007), muhah (Meier in sod., 2006) ter polžih (Meyer in Paulay, 2005). Meyer in Paulay (2005) razlagata vrzel v črtni kodi kot artefakt, ki se pojavi pri nezadostnem vzorčenju tako osebkov različnih vrst kot osebkov znotraj vrste.

1.4 ČRTNE KODE DNA IN MORFOLOGIJA

Morfologija je veja v biologiji, ki se ukvarja z obliko in strukturo organizmov, organov tkiv in celic. Morfologija je tudi osnova, na katero se je do nedavnega zanašala taksonomija. Kako pa je povezana morfološka podobnost oziroma različnost med vrstami s ČKD? Za to vprašanje si moramo najprej ogledati pojem molekularna ura. Molekularno uro sta leta 1965 predstavila Zuckerkandl in Pauling (1965) in je eno temeljnih odkritij evolucijske biologije. "Tik" v času predstavlja mutacija. Te se fiksirajo in kopičijo. Tako lahko, če poznamo stopnjo hitrosti in število mutacijskih "tikov", določimo koliko časa sta

vrsti ločeni ena od druge, saj molekularni čas teče dokaj linearno (Janecka in sod., 2012). Hitro so znanstveniki opazili, da se hitrost molekularne ure med geni razlikuje in različne vrste organizmov, vendar pa se vseeno v grobem obnaša kot ura (Janecka in sod., 2012). Morfološka evolucija pa teče precej manj enakomerno in manj predvidljivo; hitrosti molekularne in morfološke evolucije nista neposredno povezani (Bromham in sod., 2002; Davies and Savolainen, 2006; Goldie in sod., 2011).

Tudi ČKD, ki temeljijo na delu gena za CO1, naletijo na neujemanje morfoloških in genetskih razlik. Pri skupini metuljev, kjer so vrste ekološko in morfološko jasno prepoznavne, se ČKD razlikujejo le v enem do treh nukleotidov (Burns in sod., 2007). Še bolj očiten je primer, kjer so v »eni vrsti« metulja s ČKD našli kar deset kriptičnih vrst, vse pa imajo morfološko skoraj identične odrasle osebkke (Hebert in sod., 2004b). Podobne primere najdemo tudi pri drugih taksonih (Meier in sod., 2006; Tavares in sod., 2011; Veijalainen in sod., 2011). Iz vseh teh različnih podatkov predvidevamo, da z variabilnostjo v ČKD bolj korelira dolžina časa od ločitve dveh vrst, kot morfološke razlike sorodnih vrst.

1.5 ČRTNE KODE DNA IN BIOGEOGRAFIJA

Biogeografija preučuje razširjenost taksonov v geografskem prostoru in času (Gailis in Kalninš, 2010). Glede na trenutno razmerje hitrosti odkrivanja novih vrst ter izumiranja obstaja velika verjetnost, da bodo številne vrste izumrle še preden jih bomo odkrili (Hendry in sod., 2010). Natančna identifikacija je torej prvi korak k uspešni ohranitvi vrst lokalne in globalne biodiverzitete (Milne in sod., 2009; Oliveira in sod., 2010), kar še posebej velja za endemične vrste. Tu se postavlja vprašanje, ali lahko ČKD zanesljivo razlikujejo vrste z lokalno razširjenostjo (endemične) med sabo oziroma od takih z širokim arealom? Kako so uspešne, če so te vrste ozko sorodne? ČKD so se že izkazale uporabne pri identifikaciji dveh endemičnih vrst rib istega rodu iz Patagonije, ki sta ogroženi zaradi invazivnih salmonidov. Njunu varovanje je oteženo zaradi ovir v morfološki identifikaciji. ČKD so med njima razkrile majhno znotrajvrstno ter kar 80-krat višjo medvrstno variabilnost (Vanhaecke in sod., 2012).

Kako pa so uspešne ČKD pri razlikovanju sorodnih vrst na velikem geografskem območju? Študija na vodnih hroščih, ki jo je izvedel Bergsten in sodelavci (2012), pojasnjuje naraščanje znotrajvrstne variabilnosti v ČKD s povečevanjem vzorčnega območja določene vrste. Še bolj zanimivo je, da se hkrati drastično zmanjša povprečna medvrstna genetska razdalja do t. i. najbližjega soseda (*nearest neighbor*), ki predstavlja najsorodnejšo vrsto v izbranem območju. V primeru vodnih hroščev povprečna genetska razdalja, izračunana z Kimurinim dvoparametričnim modelom (K2P), do najbližjega soseda znaša 7% v območju enega kilometra, ki pa se zmanjša na manj kot 3,5%, če vzorčenje razširimo na 6000 km (Bergsten in sod., 2012).

Odvisnost znotrajvrstnih genetskih razlik od geografskega merila vzorčenja je pričakovati zaradi splošno priznanih konceptov, kot je »*distance decay*« (Nekola and White, 1999) in »*isolation by distance*« (Wright, 1943), kot tudi iz filogeografskih študij (Avice, 2000). Kot splošno pravilo, bodo vrste, ki so bile vzorčene na širšem geografskem območju, prikazale višjo genetsko variabilnost, kot bi bila ta predvidena iz manjšega območja.

Nekaj študij pa vseeno predlaga, da genetska in geografska oddaljenost nista soodvisni (Hebert in sod., 2004a, 2010). Ta odstopanja od rezultatov, ki bi jih pričakovali glede na prej omenjene teorije, Bergsten in sodelavci (2012) pojasnjujejo kot morebitno napako, saj so bile te študije narejene na manjših geografskih območjih in na organizmih, ki se uspešneje razširjajo kot prej omenjeni vodni hrošči.

Skupni učinek (zmanjševanje medvrstne oddaljenosti od najbližjega sorodnika ter večanje znotrajvrstnih razlik) geografske odvisnosti bi torej lahko otežil zanesljivo prepoznavanje vrst. Zlati problematično bi bilo, če ČKD ne bi mogle razlikovati endemičnih ali ogroženih vrst od njihovih bližnjih kozmopolitskih sorodnikov ali morda celo katere invazivne vrste. V primerjavi ČKD z referenčno knjižnico bi bilo tako za višjo natančnost smiselno upoštevati tudi geografski izvor vrste ter, kadar je geografski izvor vrste znan, omejiti iskanje najprej na lokalno (Bergsten in sod., 2012).

1.6 ČRTNE KODE DNA IN FILOGENIJA

Filogenija je študij sorodstvenih odnosov med skupinami organizmov (npr. vrst ali populacij) na podlagi aminokislinskih in nukleotidnih zaporedij ali morfoloških znakov. Rezultat filogenetske analize je hipoteza o sorodstvenih odnosih, ki jih predstavljamo s pomočjo filogenetskih dreves.

Fitch in Margoliash (1967) sta prva uporabila molekulske podatke za izdelavo filogenetskega drevesa. To drevo je bilo tako podobno tistim že uveljavljenim filogenetskim drevesom vretenčarjev, da so taksonomi uvideli pomembnost molekularnih podatkov kot potencialne končne ali potrditvene dokaze (Singh, 2012). Vključitev molekularskih sekvenc v filogenetske analize je v zadnjih dveh desetletjih revolucionizirala filogenijo (Pagel, 1999). Do nedavnega je bila selekcija genov za analize omejena na tiste, ki so bolj univerzalni in lažji za sekvenciranje, kot so na primer ribosomalni geni. Tehnološki napredek danes omogoča vključevanje raznovrstne informacije z večih lokusov, lahko tudi z različnih genomskih predelov (jedro, mitohondriji, kloroplasti). Tako so filogenetske analize natančnejše (Hajibabaei in sod., 2006c), poleg tega pa se izognejo napakam, ki so povezane z značilnosti določenega gena (Foster in Hickey, 1999). Z napredkom projektov sekvenciranja celotnega genoma in dostopnostjo tovrstnih analiz pa je mogoče, predvsem za prokariote in evkariote z mahnimi genomi tovrstne analize izvesti tudi na celotnih genomih preučevanih organizmov (Murphy in sod., 2004).

Natančnost filogenetske analize poveča tudi dodajanje novih taksonov v analizo (Hajibabaei in sod., 2007). Zviševanje števila taksonov zmanjšuje dolžino vej filogenetskega drevesa in zmanjšuje napake, ki so posledica homoplazij (Huelsenbeck, 1995; Kolaczkowski in Thornton, 2004). Homoplazija je skupna lastnost/znak različnih vrst, ki ni podedovana od skupnega prednika, temveč se je pojavila tekom konvergentne evolucije (Hajibabaei in sod., 2007). Nekateri znanstveniki celo trdijo, da je dodajanje večih taksonov v analizo bolj pomembno za filogenetsko ločljivost, kot dodajanje večih genov (Pollock in sod., 2002; Zwickl in Hillis, 2002; Wiens, 2006). Zviševanje sposobnosti ločevanja taksonov (filogenetske ločljivosti) uporabljenih filogenetskih

pristopov na tak način, pa bi bilo lahko zlasti učinkovito za analize s ČKD, kjer lahko hkrati analiziramo stotine ali celo tisoče vrst (Wilson, 2011a).

Knjižnice ČKD imajo nekatere podobnosti s podatki molekularne filogenije, vendar ČKD običajno nimajo dovolj filogenetsko uporabne informacije oz. tako imenovanega filogenetskega signala, za natančen opis starejših sorodstvenih odnosov (Hajibabaei in sod., 2006a). Čeprav sekvence ČKD običajno analiziramo s pomočjo hierarhično urejenih odnosov povzetih v obliki dendrograma so algoritmi, ki jih pri tem uporabljamo, npr. združevanje sosedov (*neighbour joining*, N-J), drugačni od algoritmov, ki jih uporabljamo v filogenetskih analizah (Hajibabaei in sod., 2006a). Študije, ki so analizirale uporabnost ČKD v filogenetskih analizah niso uspeli potrditi zanesljive in pravilne razrešitve evolucijskih odnosov (Tautz in sod., 2003; Savolainen in sod., 2005; Hajibabaei in sod., 2007; Wilson, 2010). ČKD torej ustrezajo seznamu (*checklist*) listov filogenetskega drevesa, ne pa tudi vejitvam tega drevesa (Crandall in Buhay, 2004).

1.7 ČRTNE KODE DNA IN PAJKI

Pajki so pestra skupina organizmov, ki se z več kot 44000 opisanimi vrstami (Platnick, 2013) uvrščajo na sedmo mesto vseh živalskih redov glede na število vrst (Coddington in Levi, 1991). Ocena števila vseh vrst pajkov je težavna. Po eni strani se je z oceno števila vrst pajkov ukvarjalo le malo ljudi, po drugi strani pa tovrstne ocene otežujejo številne napake pri poimenovanju (sinonimi). Coddington in Levi (1991) sta ocenila, da se število vseh vrst pajkov giblje okoli 170000 in ta ocena se še danes najpogosteje uporablja.

Pajke najdemo v mnogih kopenskih habitatih, tudi v ekstremnih kot so puščave, vrhovi gora in območje plimovanja. Vrsto *Argyroneta aquatica* najdemo celo v stoječih sladkih vodah. Brez pretiravanja lahko rečemo, da najdemo pajke v praktično vseh celinskih habitatih, saj manjkajo le na skrajnem severu in jugu Zemlje (Foelix, 2011). So najrazličnejših oblik, velikosti pa nihajo od 0,43 mm (*Patu marplei*) do več kot 280 mm (*Theraphosa blondi*). Kot obligatni plenilci igrajo pomembno ekološko vlogo v vseh kopenskih ekosistemih ter so pomembni pri biokontroli žuželk (Foelix, 2011). Danes je znana le ena pretežno rastlinojeda vrsta iz skupine skakačev (Salticidae), *Bagheera kiplingi*

(Meehan in sod., 2009). Prav tako izredno zanimivo je njihovo vedenje, z zapletenimi paritvenimi plesi, zalezovanjem plena, zmožnostjo učenja, morda še najbolj zanimivi pa so njihovi številni vzorci pletenja mrež (Foelix, 2011).

Morfološka identifikacija pajkov je zahtevna. Ker prepoznavo vrst temelji na strukturi genitalij, je mlade pajke je večinoma nemogoče identificirati do vrste. V zadnjem času opažajo tudi znotrajvrstne polimorfizme v genitalijah, kar še otežuje pravilno prepoznavo vrst (Huber in Gonzalez, 2001). Dodaten problem je tudi izreden spolni dimorfizem. Samci in samice se lahko zelo razlikujejo, poznamo pa celo velikostni dimorfizem znotraj enega spola. Tak primer so nekatere vrste rodu *Nephilla*, kjer se tudi odrasle samice še naprej levijo in rastejo (Kuntner in sod., 2012). Ta pojav pogosto opazimo pri »primitivnejših pajkih« iz skupine Mygalomorphae, pri evolucijsko mlajših (Araneomorphae), kamor spada tudi prej omenjen rod *Nephilla*, pa je ta pojav prej izjema kot pravilo. Ali lahko pri identifikaciji pajkov pomagajo ČKD? Barrett in Hebert (2005) pravita, da lahko. V analizi 168 vrst pajkov, sta s pomočjo ČKD vse osebkke pravilno prepoznala, četudi kasneje Prendini (2005) avtrojema očita slab izbor rodov, premajhno število vrst in geografsko pristranskost. O podobno vzpodbudnih rezultatih uporabe ČKD poročajo v študiji na morfovvrstah, z širšim naborom podatkov (Robinson in sod., 2009).

1.8 TRAJNO OHRANJANJE BIODIVERZITETE IN FAVNISTIČNI PRISPEVEK NALOGE

Klimatske spremembe, urbanizacija, sečnja gozdov in onesnaženost spreminjajo večino ekosistemov na Zemlji hitreje, kot se spremembam organizmi lahko prilagajajo (Dornelas in sod., 2013). Raziskovanje biodiverzitete in njeno ohranjanje so torej ena glavnih nalog človeštva (Hoban in Vernesi, 2012). Trenutna prizadevanja v tej smeri so premalo učinkovita (Hoban in Vernesi, 2012), zato se je pojavilo nekaj novih pristopov k ohranjanju biodiverzitete, med njimi tudi ohranjanje globoko zamrznjenih vzorcev (*cryo-preservation*). Smithsonian Institution je nedavno zagnal projekt Global Genome Initiative (GGI, 2013), katerega cilj je shranjevanje tkiv in dednega materiala mnogih tarčnih organizmov, ter omogočiti dostop do tega materiala prihodnjim generacijam. Prav tu bodo trajno shranjena tkiva ter dedni material naših vrst pajkov, kjer bodo služili kot referenca za

trenutno biodiverzitetu na zemlji. Referenčni osebki, oziroma v nekaterih primerih le njihovi diagnostični deli, ki so nujno potrebni za identifikacijo (genitalije), bodo shranjeni deloma na biološkem inštitutu Jovana Hadžija, ZRC SAZU, v Sloveniji in deloma v prirodoslovnem muzeju (Naturhistorisches Museum der Burgergemeinde) v Bernu, Švica.

Naših 324 vrst pajkov prinaša tudi favnistične podatke za Slovenijo in Švico, seznama vrst in lokacij se nahajata v prilogah A in B. Ob hitrem pregledu literature smo opazil, da le ena študija v zmerno toplem pasu poroča o več kot 300 vrstah pajkov (Blick, 2011) ter še ena o več kot 275 vrstah (Blick, 2009), kar je bil tudi naše izhodišče.

1.9 CILJI NALOGE

Prvi cilj te naloge je bilo testiranje uporabnost ČKD na področju taksonomije pajkov, kako zanesljive so pri identifikaciji vrst glede na medvrstne in znotrajvrstne genetske variabilnosti. Drugi cilj je bil ugotoviti, ali obstaja odnos med morfološki značilnostmi vrst ter variabilnostjo v ČKD. Tretji cilj naloge je bil ugotoviti uporabnost ČKD na področju biogeografije oz. kakšna je variabilnost ČKD glede na velikost geografskega območja vzorčenja vrste. Kot zadnji cilj smo si zastavili preveriti še, na kakšnih nivojih lahko ČKD uspešno (glede na že obstoječe filogenije) opišejo filogenetske odnose.

Analize temeljijo na štirih osrednjih vprašanjih:

1. Ali obstaja vrzel med ČKD?
2. Ali visoka oz. nizka variabilnost ČKD korelira z vrstami, ki imajo visoko oz. nizko značilne morfološke karakteristike?
3. Ali obstaja povezava med velikostjo geografskega območja vzorčenja vrst ter variabilnostjo v ČKD?
4. Ali vsebuje kombinacija 444 taksonov in 649 nt dolgih ČKD dovolj filogenetsko uporabne informacije za ustrezno pojasnitev filogenetskih odnosov?

Poleg zastavljenih ciljev, je naš namen tudi prispevati favnistične podatke ter fotografije identificiranih pajkov. Pridobljene ČKD bodo v pomoč pri gradnji zanesljive referenčne

knjižnice ČKD in bodo prosto dostopne na spletu. Trajno zamrznjena tkiva in dedni material pajkov pa bo prispeval k trajnemu ohranjanju biodiverzitete.

2 METODE

2.1 TERENSKO DELO IN IDENTIFIKACIJA

Terensko delo je obsegalo dva tedna vzorčenja v Švici na 33 lokacijah in več terenskih dni v Sloveniji na 76 lokacijah. Vzorčili smo širok nabor habitatov (jame, visokogorja, obala, urbana naselja ...) z namenom, da ulovimo čim večje število vrst.

Uporabljali smo selektivne in neselektivne metode vzorčenja. Selektivno smo pajke nabirali ročno, z pincetami in ekshaustorji, predvsem pod kamenjem, za lubjem, v zemlji in drugje, kjer so bile neselektivne metode težje izvedljive. Med slednjimi metodami pa smo najpogosteje uporabljali lovilne žaklje za pajke »kečerje«, ki so učinkovite predvsem za vzorčenje na travnikih. Po vzorčenju smo iz lovilnega žaklja z mešanim naborom vrst z ekshaustorji izbrali odrasle pajke. Mladostnih pajkov nismo nabirali, saj je njihova identifikacija do nivoja vrste v večini primerov nemogoča. Prav tako smo se izogibali lovljenju vrst, za katere smo bili prepričani, da se ponavljajo, saj je bil naš namen dobiti le čim bolj raznolik vzorec. Uporabili smo tudi metodo za vzorčenje dreves in grmovja (*beating*), kjer smo otresali veje rastlin nad belim platnom ali svetlim narobe obrnjenim dežnikom. Tu so se zbirali nevretenčarji, izmed katerih smo selektivno nabrali pajke. Sejali smo tudi listno steljo ter mah. V sejalnik smo naložili material iz gozdnih tal ter močno stresali nekaj minut. Presejani material smo stresli na belo platno, s katerega smo polovili odrasle pajke.

Najpogosteje uporabljena metoda oz. metoda s katero smo nabrali največje število vrst je bila sesanje z razpihovalnikom listja. Na cev razpihovalnika smo namestili filter iz blaga (v nekaterih primerih grobo blago, v drugih pa blago za zavese), kamor so se ujeli pajki ter ostal organski material. Vsebino iz filtra smo nato stresli na belo platno (npr. rjuha) ter pobrali pajke.

Ulovljeni pajki so bili takoj shranjeni v 96 % etanolu, ter shranjeni v zamrzovalniku takoj, ko je bilo mogoče. Tam so počakali do identifikacije. Pajke smo identificirali z uporabo internetnega določevalnega ključa (Nentwig in sod., 2013).

2.2 IZOLACIJA DNK IN PCR

Mitohondrijsko DNK smo izolirali iz nog pajkov. V primeru zelo majhnih osebkov smo uporabili celotno glavoprsje z nogami. Izolacija DNK je potekala z avtomatskim sistemom za ekstrakcijo DNK, MagMAXTM Express magnetic particle processor Type 700 (Applied Biosystems®). Uporabljali smo njihov komplet za ekstrakcijo in sledili protokolom proizvajalca.

Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo pri vseh vrstah pomnožili del mitohondrijskega gena za CO1. Vse reakcije so imele prostornino 25 µl, ki so jo sestavljali: 13,1 µl dvojno destilirano (dd) H₂O, 5 µl 5x PCR pufra "GoTaqFlexi" (Promega), 2,25 µl MgCl₂ (25 mM, Promega), 0,15 µl polimeraze "5U GoTaqFlexi Polimerase" (Promega), 2,5 µl "dNTP Mix" (2 µM vsak, Biotools), 0,5 µl napredujočega (*forward*) in 0,5 µl reverznega (*reverse*) 20 µM primerja ter 1,5 µl DNA. Nekaterim reakcijam smo dodali 0,15 µl govejega albuminskega seruma (Promega, Fitchburg, Wisconsin; 10mg/ml) in temu primerno zmanjšali volumen vode.

PCR smo izvajali z napravo "2720 Thermal Cycler" (Applied Biosystems) in "Mastercycler® ep" (Eppendorf).

Uporabili smo štiri različne začetne oligonukleotide, vodilna (*forward*) sta bila LCO1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) (Folmer in sod., 1994) in njegove degenerirane oblike (*degenerate* LCO1490) (GGTCAACAAATCATAAAGAYATYGG) (Folmer in sod., 1994). Reverzna (*reverse*) primerja pa sta bila HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA) (Folmer in sod., 1994) in Chelicerate-R2 (GGATGGCCAAAATCAAATAAATG) (Barret in Hebert, 2005). Najpogosteje smo uporabili kombinacijo LCO1490 in HCO2198, kadar pa nismo uspešno pomnožili željenega dela gena, smo preizkusili še druge kombinacije ter izbrali najboljšo.

Večinoma smo za pomnoževanje uporabili naslednji PCR protokol: denaturacija pri 94 °C za 2 min, ki mu sledi 35 ciklov (94 °C za 40 sek, 48 °C – 52 °C za 1 min, 72 °C za 1 min) in zadnja faza podaljševanja na 72 °C za 3 min.

Pri nekaterih problematičnih vzorcih smo uporabili tudi program »touch up« s PCR protokolom: denaturacija pri 96 °C za 10 min, ki mu sledi 20 ciklov (94 °C za 1,5 min, 48 °C – 52 °C za 2 min, 72 °C za 2 min) in nato še 15 ciklov (94 °C za 1,5 min, 52 °C for 1,5 min, 72 °C za 2 min) in zadnja faza podaljševanja na 72 °C za 3 min.

2.3 ANALIZA ČRTNIH KOD DNA

Po sekvenciranju pri podjetju MacroGen smo pridobljene sekvence dela gena za CO1 uredili v programu Geneious v. 5.6.5 (Biomatters, 2012). Vse sekvence, pri katerih je bilo to mogoče, smo skrajšali na standardno dolžino informativnega dela gena CO1, toren na 649 nt dolge ČKD. Nekaj sekvenc je krajših zaradi nepojasnjenih težav pri sekvenciranju ali predhodnih postopkih. Po poravnavi vseh sekvenc z uporabo programa ClustalW smo jih izvozili kot .nex datoteko, katero smo lahko odprli v programu Mesquite v. 2.75 (Maddison in Maddison, 2011). V tem programu smo določene sekvence preimenovali, pregledali za morebitne napake ter izvozili datoteko kot *simple* .nex. Ta format je primeren za uvoz v program MEGA v. 5.1 (Tamura in sod., 2011). S pomočjo tega programa smo izračunali medvrstne in znotraj vrstne genetske razdalje različno definiranih skupin, na čemer temeljijo tudi vse nadaljnje statistične analize. Vsi izračuni genetskih razdalj so temeljili na računanju razdalj med pari (*pairwise distances*) oz. izračuna povprečne genetske razdalje v skupini (*within group mean distance*) ali med skupinami (*between group mean distance*). Vse nastavitve pri teh izračunih so ostale enake privzetim, z izjemo izbire modela/metode, kjer smo uporabili na Kimurin dvo-parametrični model (K2P) (Kimura, 1980).

2.4 PODATKI IN STATISTIČNA OBDELAVA

Končni obseg podatkov v nalogi je sestavljen iz več kot 1600 identificiranih odraslih pajkov, ki pripadajo 324 vrstam iz 183 rodov ter 33 družin (Priloga A). Pridobili smo ČKD

za 444 osebkov. ČKD so skupaj s fotografijami pajkov za večino vrst objavljene na spletni strani laboratorija za evlucijsko zoologijo (EZlab, 2013).

2.4.1 Vrzel med črtnimi kodami DNA

Za testiranje obstoja vrzeli med ČKD smo najprej izračunali povprečne K2P genetske razdalje znotraj vsakega rodu, ki je bil zastopan z dvema ali več vrstami, takih rodov je bilo 48. Pridobljeno povprečje znotraj vsakega rodu smo nato združili v kategorijo 'rod', ki predstavlja povprečne medvrstne genetske razdalje. Nato smo izračunali tudi povprečne K2P genetske razdalje znotraj vsake vrste, ki je bila zastopana z dvema ali več osebki, takih vrst je bilo 134. Pridobljena povprečja teh znotraj teh vrstnih smo nato združili v kategorijo 'vrsta', ki predstavlja povprečne znotrajvrstne genetske razdalje. Normalnost porazdelitve podatkov smo v obeh kategorijah testirali s Kolmogorov-Smirnov testom. Zaradi nenormalno razporejenih podatkov v kategoriji 'vrsta' smo skupini ('rod', 'vrsta') primerjali med sabo z neparametričnim testom Mann-Whitney, ki nam pove ali obstajajo statistično značilne razlike med skupinama. Grafično predstavitev (slika 1) in statistične analize smo opravili v programu SPSS (IBM, 2011). Sliko 2 smo izrisali v programu JMP (SAS, 2007). Velikost vrzeli med ČKD smo pridobili iz razmerja median obeh kategorij.

2.4.2 Značilnost morfoloških znakov in variabilnost črtnih kod DNA

Pri tej analizi nas je zanimalo, če so ČKD med vrstami bolj variabilne, v primeru morfološko dobro oz. slabo definiranih vrst. Primerjali smo povprečne K2P medvrstne genetske razdalje znotraj rodov, ki so bili zastopani z dvema ali več vrstami, takih rodov je bilo 48. Vsakemu rodu, ki je vseboval vrste z visoko značilnimi morfološkimi znaki smo pripisali oznako 'visoka'. Vsakemu rodu, ki je vseboval vrste z nizko značilnimi morfološkimi znaki pa smo pripisali oznako 'nizka'. Tako smo ustvarili dva razreda, 'visoka' in 'nizka', ki predstavljata povprečne K2P medvrstne genetske razdalje znotraj rodu, glede na visoke oz. nizke morfološke značilnosti njihovih vrst. Kriterij za razporejanje v razreda je temeljil na naših izkušnjah z identifikacijo pajkov. Glede na subjektivna opažanja pri identifikaciji vrst znotraj določenega rodu smo, kot so npr. zelo podobne oz. zelo različne epigine ali pedipalpi (samičine in samčeve genitalije na katerih

temelji identifikacija), značilni izrastki in drugo, smo se odločili ali rodu pripišemo oznako za visoko ('visoka') oz. nizko ('nizka') morfološko značilnost njihovih vrst. Za uvrstitev v razred 'visoka' je bila dovolj že visoka morfološka značilnost pri vsaj enem spolu. Statistično analizo in grafični prikaz (slika 3) smo opravili v programu SPSS v. 20 (IBM, 2011). Normalnost porazdelitve podatkov smo testirali s Kolmogorov-Smirnov testom za vsako skupino. Podatki so bili normalno razporejeni, zato smo statistično značilne razlike iskali z enosmernim testom ANOVA. Faktor v analizi je bila morfološka značilnost ('visoka' in 'nizka'), odvisna spremenljivka pa K2P genetska razdalja. Vsi uporabljeni podatki se nahajajo v prilogi C.

2.4.3 Geografsko območje vzorčenja in variabilnost črtnih kod DNA

Za test uporabnosti ČKD pri identifikaciji osebkov iz različno velikih geografskih območij ter s tem vpogled na njihovo uporabnost na področju biogeografije, smo podatke pridobili iz podatkovne baze BOLDSYSTEMS (Ratnasingham in Hebert, 2007). Za razliko od genetskih razdalj izračunanih s K2P modelom (*K2P distance*), ki jih uporabljamo v nalogi, v tej podatkovni bazi za genetske razdalje uporabljajo p-razdaljo (*p-distance*). Zaradi tega tudi nismo združevali njihovih in naših podatkov. Uporabljene podatke lahko najdete v prilogi D. Uporabili smo povprečne znotrajvrstne genetske p-razdalje in ustvarili tri skupine ('1', '2', '3'). V skupino '1' smo vključili deset vrst pajkov (oz. povprečno znotrajvrstno p-razdaljo za vsako vrsto), ki so bili vzorčeni le na enem kontinentu oz. je bila njihova ČKD znana le iz enega kontinenta. V skupino '2' smo vključili deset vrst pajkov, vzorčenih na dveh kontinentih (torej z znanimi ČKD le iz dveh kontinentov). V skupino '3' smo vključili deset vrst pajkov z znano ČKD iz treh kontinentov. Za vsako skupino ('1', '2', '3') so bile vrste naključno izbrane iz zgoraj omenjene podatkovne baze. Število osebkov znotraj vrste je različno, saj smo uporabili vse možne dostopne podatke o določeni vrsti. Podatke smo nato statistično obdelali v programu SPSS v. 20 (IBM, 2011). Za vsako skupino smo najprej testirali normalnost porazdelitve podatkov s Kolmogorov-Smirnov testom. Nato smo uporabili enosmerni test ANOVA, kjer smo kot faktor uporabili število kontinentov kjer je bila vrsta vzorčena oz. kjer je znana ČKD. Za odvisno spremenljivko smo določili genetske p-razdalje. Opravili smo tudi post-hoc Bonferroni korekcijo. Rezultate smo prikazali tudi grafično (slika 4).

2.4.4 Filogenija z uporabo črtnih kod DNA

Za rekonstrukcijo evolucijskih odnosov smo uporabili Bayesovo filogenetsko analizo z uporabo programa MrBayes v. 3.2.0 (Ronquist in sod., 2012). Analiza je potekala s privzetimi nastavitvami, z izjemo spremembe števila generacij na 15 milijonov. Uporabili smo 444 taksonov s standardno 649 nt dolgo ČKD. Za izbiro najprimernejšega substitucijskega modela smo te podatke testirali v programu MEGA 5.1 (Tamura in sod., 2011), ki nam je predlagal model »Gamma distributed with Invariant sites« (G+I). Analiza je potekala na spletnem portalu CIPRES Science Gateway (Miller in sod., 2010).

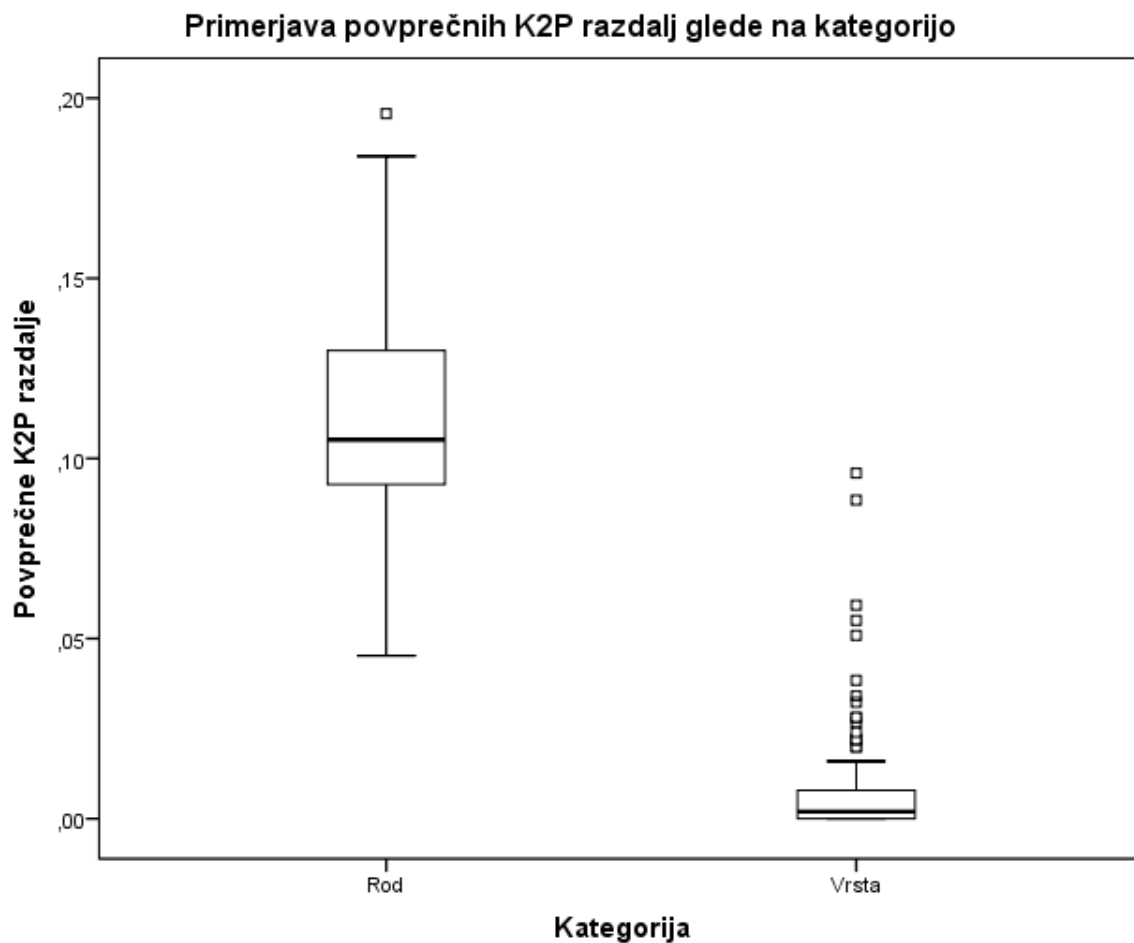
3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 VRZEL MED ČRTNIMI KODAMI DNA

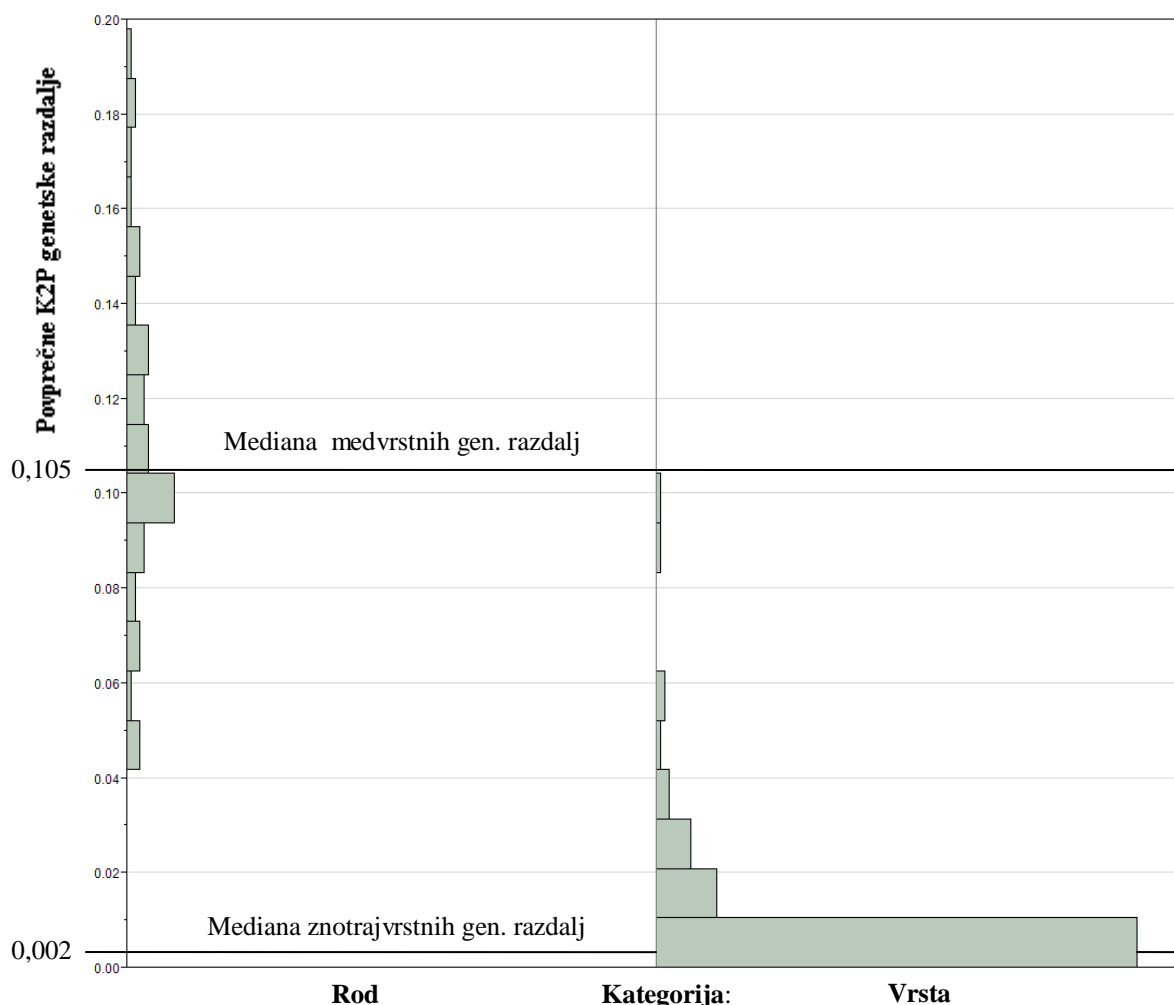
Povprečne znotrajvrstne K2P genetske razdalje v kategoriji vrsta niso bile razporejene normalno (Kolmogorov-Smirnov $p=0$), zato smo za primerjavo obeh skupin ('rod' in 'vrsta') uporabili neparametrični Mann-Whitney test. Skupina 'rod' predstavlja povprečne medvrstne K2P genetske razdalje, skupina 'vrsta' pa povprečne znotrajvrstne genetske razdalje. Test Mann-Whitney je pokazal statistično značilno razliko med obema skupinama ($p<0,001$). Zaradi nenormalno razporejenih podatkov smo za povprečno vrednost uporabljali mediano. Ta je bila v skupini 'rod' kar 54-krat višja kot v skupini 'vrsta'. Osnovni opisni statistični podatki so v preglednici 1.

Preglednica 1: Opisna statistika podatkov uporabljenih za testiranje obstoja vrzeli med črtnimi kodami DNA. Kategorija Rod predstavlja povprečne medvrstne, kategorija Vrsta pa povprečne znotrajvrstne K2P genetske razdalje.

Kategorija	N	Mediana	Interkvartilni rang	Razpon vrednosti	
				Min.	Maks.
Rod	48	0,10522	0, 03732	0,04522	0,19570
Vrsta	134	0,00196	0,00789	0	0,09592



Slika 1: Primerjava medvrstnih in znotrajvrstnih povprečnih K2P genetskih razdalj. V prvi kategoriji (rod) so prikazane medvrstne genetske oddaljenosti, v drugi (vrsta) pa znotrajvrstne. Prikazane so mediane vrednosti ter interkvartilni razredi obeh kategorij.



Slika 2: Drug prikaz primerjave medvrstnih in znotrajvrstnih povprečnih K2P genetskih razdalj. Razredi na y osi predstavljajo povprečne genetske K2P razdalje, velikost razredov pa narašča po 0,1. Dolžina trakov predstavlja število taksonov kategorije v posameznem razredu povprečnih K2P genetskih razdalj.

Kot v uvodu opisano, je Hebert (2003) za mejo obstoja vrzeli določil 10-krat višjo povprečno medvrstno kot znotrajvrstno K2P genetsko oddaljenostjo. Z našimi podatki smo jasno pokazali, da ta vrzel med ČKD obstaja, saj je bila mediana kategorije 'rod' (povprečne medvrstne K2P genetske razdalje) kar 54 krat višja od mediane kategorije 'vrsta' (povprečne znotrajvrstne K2P genetske razdalje). To pa naj bi pomenilo, da so ČKD zanesljive za določanje vrst pri pajkih in bi določile večino osebkov v pravilni takson z zanemarljivo napako (Hebert, 2004a; Barret in Hebert, 2005).

Čeprav je naš nabor podatkov relativno velik glede na favnistične študije pajkov, ki zelo redko poročajo preko 300 vrst, je to še vedno le majhen odstotek v primerjavi z vsemi, več

kot 44 000 znanimi vrstami pajkov (Platnick, 2013) ali vsemi znanimi vrstami v Evropi, kjer se številka trenutno giblje pri nekaj manj kot 4900 (Van Helsdingen, 2012). Za zanesljivejšo potrditev vrzeli bi potrebovali več podatkov, predvsem pa več vrst iz istega rodu ter več osebkov iste vrste. Analizo bi lahko izboljšali z vključitvijo podatkov iz podatkovne baze BOLDSYSTEM (Ratnasingham in Hebert, 2007) v naše podatke.

Pri analizi vrzeli v ČKD je realno število vrst vključenih v analizo precej manjše od celotnega števila 324, saj jih je kar 124 oziroma 38,27% zastopanih z enim samim osebkom. Zaradi tega so bili za večino analiz neuporabni, bodo pa vseeno pomembno prispevali k izgradnji zanesljive referenčne knjižnice ČKD. Nekaj ČKD v tem trenutku še vedno ni na voljo, zaradi nepojasnjenih težav pri postopku njihove pridobitve.

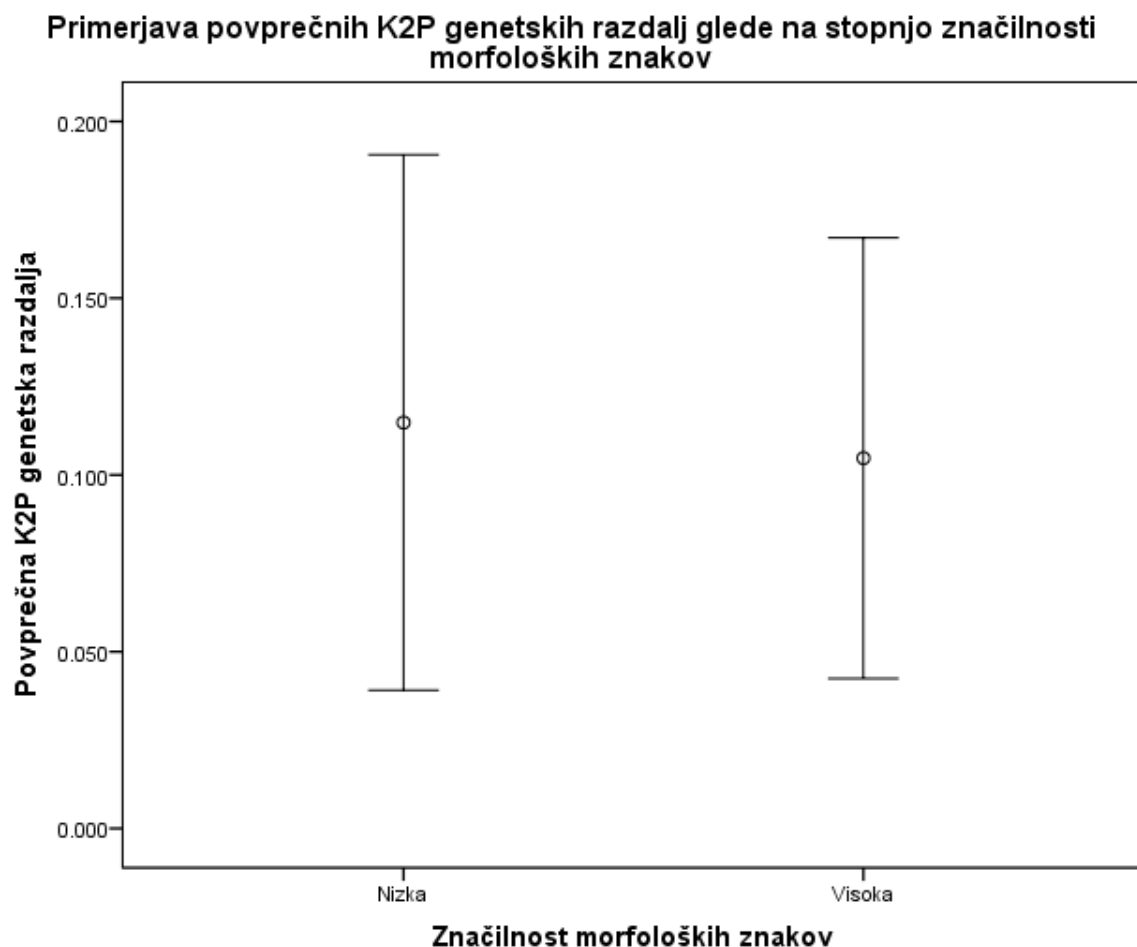
Našo vrzel moramo oceniti kritično, saj je bilo vzorčenje precej geografsko omejeno (le Slovenija in Švica), v večini vrst s ČKD pa je bila ta pridobljena le iz dveh osebkov, prav to pa kot možno pristranskost navajata Meyer in Paulay (2005).

3.2 ZNAČILNOST MORFOLOŠKIH ZNAKOV IN VARIABILNOST ČRTNIH KOD DNA

Osnovni statistični podatki so v preglednici 2. Podatki znotraj obeh kategorij, 'nizka' in 'visoka' glede na značilnosti morfoloških znakov, so bili normalno razporejeni (Kolmogorov–Smirnov za 'nizka' $p=0,20$, za 'visoka' $p=0,155$). Enosmerni test ANOVA povprečnih K2P razdalj obeh kategorij ni pokazal statistično značilnih razlik ($p=0,335$). Na grafičnem prikazu (slika 3) vidimo aritmetična povprečja in ± 2 SD.

Preglednica 2: Opisna statistika podatkov uporabljenih za analizo odnosa med črtnimi kodami DNA in značilnostjo morfoloških znakov. Vrednosti v preglednici temeljijo na povprečnih medvrstnih K2P genetskih razdaljah znotraj rodov.

Značilnost morf. znakov	Št. rodov	Aritmetično povprečje	SD	SE	Razpon K2P vrednosti	
					Min.	Maks.
Nizka	28	0,1148	0,0379	0,0072	0,0472	0,1957
Visoka	20	0,1048	0,0312	0,0070	0,0452	0,1571



Slika 3: Primerjava povprečnih K2P genetskih razdalj skupin rodov, glede na značilnost morfoloških znakov njihovih vrst. Na sliki so prikazana aritmetična povprečja obeh skupin ter ± 2 SD.

Rezultati nakazujejo, da so ČKD enako zanesljive oz. nezanesljive pri identifikaciji morfološko podobnih in manj podobnih vrst. V našem primeru se ponovno srečamo z rodovi, ki so zastopani s premajhnim številom vrst, kot bi bilo potrebno za natančnejše rezultate. Pojavijo se lahko namreč pristranskosti kot npr. v primerih, kjer sta znotraj rodu zastopani le dve sestrski vrsti, kar zelo zmanjša realno povprečno medvrstno genetsko razdaljo znotraj rodu. V obratnem primeru lahko majhno število vrst znotraj rodu, ki si niso blizu sorodne, poveča realno povprečno znotrajrodovno medvrstno genetsko razdaljo.

Porazdelitev rodov v le dve kategoriji ('visoka' in 'nizka') je zelo grob prikaz morfoloških karakteristik znotraj rodu. Verjetno bi bilo v primeru podobnih analiz primerno ustvariti vsaj še tretji, srednji, razred. Vsekakor pa tudi ti rezultati podpirajo teoretično napoved, ki

pravi, da morfološka in molekularna evolucija pogosto nista povezani (Bromham in sod., 2002; Davies and Savolainen, 2006; Goldie in sod., 2011)

3.3 GEOGRAFSKO OBMOČJE VZORČENJA IN ČRTNE KODE DNA

Osnovni statistični podatki te analize so prikazani v preglednici 3. Potrebno je opozoriti, da podatkovna baza BOLDSYSTEMS (Ratnasingham in Hebert, 2007), iz katere smo pridobili vse podatke za analizo, uporablja p-razdalje za računanje genetskih razdalj med vrstami in znotraj vrste. Skupine '1', '2', '3' predstavljajo povprečne znotrajvrstne genetske p-razdalje za deset vrst pajkov glede na število kontinentov, kjer so bili vzorčeni oz. kjer je znana njihova ČKD, torej en, dva ali trije kontinenti. Podatki iz vsake skupine so bili normalno razporejeni (Kolmogorov–Smirnov za vsako od skupine ('1', '2' in '3') $p=0.20$). Enosmerni test ANOVA je pokazal statistično značilne razlike med vsemi skupinami ($p=0,040$). Nadaljni test z Bonferronijevim popravkom pa je pokazal, da obstaja statistično značilna razlika samo med skupinama '2' in '3' ($p=0,041$), medtem, ko med skupinama '1' in '3' ($p=0,240$) ter '1' in '2' ($p=1$) ni bilo statistično značilnih razlik. Za interval zaupanja smo vzeli 95 %. Na sliki 4 vidimo primerjavo povprečnih znotrajvrstnih genetskih p-razdalj glede na število kontinentov kjer je bila vrsta vzorčena, torej kjer je znana njena ČKD. Prikazana so aritmetična povprečja z mero variabilnosti ± 2 SD.

Preglednica 3: Opisna statistika podatkov uporabljenih za analizo vpliva velikosti geografskega območja vzorčenja na variabilnost črtnih kod DNA. Vrednosti v preglednici temeljijo na povprečnih znotrajvrstnih K2P genetskih razdaljah.

Št. kontinentov	Št. vrst	Aritmetično povprečje	SD	SE	Razpon p vrednosti [%]	
					Min.	Maks.
1	10	0,7760	0,31557	0,09979	0,39	1,28
2	10	0,6270	0,35737	0,11301	0,09	1,05
3	10	1,1070	0,51925	0,16420	0,08	2,11



Slika 4: Primerjava povprečnih znotrajvrstnih genetskih p-razdalj, glede na število kontinentov kjer je bila vrsta vzorčena, torej kjer je znana njena ČKD. Na sliki so prikazana aritmetična povprečja in ± 2 SD.

V tej analizi je večina vrst zastopana z velikim številom osebkov, kar nam daje relativno realne ocene variabilnosti znotraj vrste. Po primerjavi treh skupin med seboj smo opazili majhno značilno statistično razliko ($p=0,040$), po dodatnem post-hoc testu (Bonferronijev popravek) pa smo opazili, da gre le za razlike med skupinama '2' in '3', torej med pajki vzorčenimi (ter znanimi ČKD) na dveh in treh kontinentih ($p=0,041$).

Pajki se na splošno dobro razširjajo (Gillespie in sod., 2012) in imajo tako dober genski pretok (Slarkin, 1985), zato bi lahko pričakovali rezultate tudi brez statističnih razlik med testiranimi skupinami. Posledica dobre disperzije je manjša znotrajvrstna variabilnost, kot bi bila po predvidevanju teorij »distance decay« (Nekola and White, 1999) in »isolation by distance« (Wright, 1943). Podobne rezultate je opazil Hebert (2004a), ko je opravljal

raziskavo na ptičih, ki se odlično razširjajo po svetu (Gillespie in sod., 2012). To bi lahko pomenilo, da so ČKD enako zanesljive za identifikacijo pajkov ne glede na njihovo razširjenost, vendar pa se zmanjša njihova uporabnost za ostale tipe biogeografskih analiz.

Rezultati pridobljeni v nalogi verjetno ne odražajo pravilnega odnosa med velikostjo geografskega območja in variabilnostjo ČKD. Po napovedi zgoraj omenjenih teorij bi pričakovali razlike v povprečnih znotrajvrstnih genetskih razdaljah med vsemi skupinami, največjo pa med skupinama z znanimi ČKD pajkov vzorčenimh le na enem in na treh kontinentih (skupini '1' in '3'). Po drugi strani bi lahko odsotnost statistično značilnih razlik med skupinami poizkušali pojasniti z dobro zmožnostjo razširjanja in visokega genskega pretoka pajkov. Vendar pa naši rezultati prikazujejo statistično značilne razlike le med »vmesnima« skupinama '2' in '3', kar je v nasprotju z obema razlagama.

V našem primeru smo za analizo naključno izbirali različne vrste, glede na območje njenega vzorčenja, oziroma glede na izvor njene ČKD (en, dva ali trije kontinenti). Morda bi bilo smiselneje, če bi znotraj ene široko razširjene vrste pogledali, kako se spreminjajo njene ČKD. Najprej bi vzeli samo njene ČKD iz enega kontinenta, nato pa dodali še drugega, tretjega ... S tem bi se izognili pristranskosti zaradi specifičnosti vrste. Prav tako bi bilo smiselno v analizo vključiti še genetsko oddaljenost do najbližjega sorodnika ter si ogledati še to spremenljivko, saj kot napovedujejo Bergsten in sod. (2012), se ta genetska razdalja bistveno zmanjša s povečevanjem geografskega območja vzorčenja. Seveda pa bi bila potrebna tudi ciljna izbira vrst, saj imajo pri pajkih vrste različno dobre sposobnosti razširjanja. Za boljšo analizo bi bilo potrebno izbrati tudi enako število osebkov na vrsto, saj z velikim številom osebkov ene vrste vplivamo na višjo genetsko variabilnost (glede na teoriji *distance decay* (Nekola and White, 1999) in *isolation by distance* (Wright, 1943)) oz. bi vplivali na manjšo variabilnost, v primeru, ko bi ti osebki prihajali iz iste lokacije.

3.4 FILOGENIJA Z UPORABO ČRTNIH KOD DNA

Filogenetsko drevo se nahaja v prilogi F.

Kot smo že opisali v uvodu in je med znanstveniki dokaj splošno sprejeto, ČKD običajno ne vsebujejo dovolj informacije za zanesljivo in pravilno razrešitev filogenetskega drevesa. Čeprav Hajibabaei in sodelavci (2007) poudarjajo, da je izredno pomembno dodajanje taksonov za izboljšanje ločljivosti filogenije, je 649 nt dolg del gena CO1 vseeno premalo informativen, da bi v kombinaciji s 444 taksoni na nivoju vrste ustrezno opisal evolucijske odnose med taksoni. Na našem drevesu (priloga F) vidimo precej nerazrešenih odnosov, ki jih vidimo kot skupine, ki se ne razvejujejo dihotomno. Podpore cepitvam so nizke, izračunane '*posterior probabilities*' so daleč pod splošno sprejeto mejo vsaj 95 %. Malo boljše rezultate, vsaj v primerjavi z trenutno najširše sprejetimi filogenijami, opazimo na taksonomskih nivojih družin. Nekatere družine pajkov se združujejo v monofiletske skupine, kot na primer rakovičarji (Thomisidae) in skakači (Salticidae). Za rezultate, ki bi bili primerljivejši s splošno sprejetimi filogenijami, pa bi morali v analizo vključiti več genov. Glavni zaključek, ki ga lahko postavimo na področju ČKD in filogenije je torej ta, da so ČKD v filogeniji uporabne, vendar le v kombinaciji z drugimi geni.

4 SKLEPI

- Ugotovili smo, da so ČKD uporabne za identifikacijo pajkov, saj smo potrdili obstoj tako imenovane vrzeli med ČKD.
- Uporabnost ČKD se ne razlikuje pri identifikaciji vrst, ki imajo morfološko izrazitejšo značilnost, od tistih z manj izrazitimi morfološkimi značilnostmi.
- ČKD so uporabne za identifikacijo vrst pajkov, tudi če so te razširjene na širokem geografskem področju (več kontinentov), manj pa za biogeografske študije na širokem območju.

- Za filogenetske raziskave so ČKD uporabne le v kombinaciji z drugimi geni, saj kratek segment gena CO1 (649 nt) v kombinaciji s 444 taksoni ne vsebuje dovolj informacije za ustrezno razrešitev filogenetskega drevesa.

5 POVZETEK

Na svetu poznamo okoli 1,5 milijonov vrst, realno število vseh vrst pa je še veliko višje. Veda, ki se ukvarja z vrstami živih bitji, natančneje, z njihovim poimenovanjem in opisom (taksonomija), njihovimi evolucijskimi odnosi (filogenija), njihovo razporeditvijo v okolju (biogeografija), je sistematska biologija. Njena podzvrst, taksonomija, ki se ukvarja s poimenovanjem in opisom vrst, je pomembna veja biologije, ki polaga temelje za vse nadaljne raziskave na organizmih. Tradicionalno se zanaša na morfološke podatke, v zadnjih letih pa vse bolj tudi na podatke molekularne biologije. Eno izmed novejših orodij molekularne taksonomije je metoda identifikacije vrst s ČKD, ki se je pojavila pred približno 10 leti.

ČKD je kratko nukleotidno zaporedje dela mitohondrijskega gena za citokrom C oksidazo, podenote 1 (CO1 ali *cox1*), dolgo približno 650 nukleotidov (nt). Predpogoj za uspeh te metode pa je zanesljiva referenčna knjižnica ČKD, s katero lahko primerjamo svoje sekvence, da ugotovimo identiteto organizma. Predvsem je uporabna pri identifikaciji morfološko ne diferenciranih organizmov. Predlagana uporaba ČKD sega tudi v mnogo drugih področij (forenzika, prehrabena industrija, prehrabena veriga živali ...) in je običajno sprejeta kot preprosta in cenovno ugodna. Kot večina novosti v znanosti je tudi ta metoda naletela na številne kritike. Nekateri znanstveniki dvomijo o zanesljivosti identifikacije vrst, še posebej ozko sorodnih, drugi pa o primernosti izbire gena, saj ima mitohondrijski genom veliko specifičnih lastnosti, ki lahko vplivajo na napačne interpretacije rezultatov.

Nas so ČKD zanimale zlasti s stališča taksonomije, morfologije, biogeografije in filogenije, v okviru naloge pa smo si zastavili 4 glavna vprašanja.

Taksonomija: Ali obstaja vrzel med ČKD? To vrzel je definiral P. D. N. Hebert, njen obstoj pa pomeni, da lahko neznan organizem pripišemo ustrezni vrsti z zanemarljivo napako.

Morfologija: Ali visoka oz. nizka variabilnost ČKD korelira z vrstami, ki imajo visoko oz. nizko značilne morfološke karakteristike? Hitrosti molekularne in morfološke evolucije nista vedno povezani, zato nas je zanimalo ali lahko ČKD enako zanesljivo ločijo vrste z visoko od tistih z nizko značilnimi morfološkimi znaki.

Biogeografija: Ali obstaja povezava med geografskim območjem vzorčenja vrst ter variabilnostjo v ČKD? Teorije napovedujejo povečanje variabilnosti v ČKD z povečevanjem geografskega območja vzorčenja, zato nas je zanimalo, kako zanesljive so pri identifikaciji vrst na različno širokih območjih.

Filogenija: Ali vsebuje kombinacija 444 taksonov in 649 nt dolgih ČKD dovolj filogenetsko uporabne informacije za ustrezno pojasnitev filogenetskih odnosov? ČKD so rutinsko uporabljene v filogenetskih analizah vendar pa rezultati kažejo na omejeno uspešnost. Opravili smo rekonstrukcijo filogenije z Bayesovo statistiko.

Naši testni organizmi so bili pajki, ki so z več kot 44 000 vrstami na 7. mestu med živalskimi redovi. So zelo heterogena skupina, ki zaseda skoraj vse kopenske habitate, z zelo zanimivo ekologijo ter težavno morfološko identifikacijo. Naši podatki vključujejo več kot 1600 odraslih osebkov iz 324 vrst. Pridobili smo 444 ČKD, ki so objavljene na spletu z fotografijami pajkov. Te vrste prinašajo tudi favnistične podatke, vsa tkiva in DNK pajkov pa so tudi trajno globoko zamrznjena in bodo služila kot referenca trenutne biodiverzitete za prihodnje generacije. Opravljanje te naloge je zahtevalo terensko delo v Švici in Sloveniji ter laboratorijsko delo v obliki identifikacije pajkov, izolacije DNK, PCR ter urejanja in analize pridobljenih DNK sekvenc.

Naši rezultati so potrdili obstoj vrzeli med ČKD ter s tem uporabnost ČKD za identifikacijo pajkov. Pri primerjavi morfoloških značilnosti s ČKD nismo opazili razlik ter tako sklepamo, da so ČKD enako uspešne pri identifikaciji tako vrst z visoko kot vrst z

nizko značilnostjo morfoloških znakov. V sklopu biogeografije smo opazili razliko med vrstami vzorčenimi na dveh kontinentih in tistimi na treh, vendar pa je bilo v tej analizi uporabljenih premalo podatkov za zanesljive trditve. Zaradi dobrega razširjanja pajkov in s tem dobrega genskega pretoka bi lahko pričakovali tudi odsotnost kakršnih koli razlik med skupinami. Pri filogeniji smo po pričakovanjih opazili precej nerazrešenih evlucijskih odnosov in sklepamo, da so v filogenetskih analizah ČKD uporabne le v kombinaciji z drugimi geni. Naši končni sklepi so, da so ČKD uporabne predvsem za identifikacijo ter manj za biogeografske in filogenetske analize.

6 VIRI

- Armstrong K. F., Ball S. L. 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1813–1823
- Arnot, D. E., Roper C., Bayoumi, R. A. L. 1993. Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 61: 15–24
- Avise J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, Massachusetts. Harvard University Press: 447 str.
- Barrett R. D. H., Hebert P. D. N. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 83: 481–491
- Bergsten J., Bilton D. T., Fujisawa T., Elliott M., Monaghan M. T., Balke M., Hendrich L., Geijer J., Herrmann J., Foster G. N., Ribera I., Nilsson A. N., Barraclough T. G., Vogler A. P. 2012. The Effect of Geographical Scale of Sampling on DNA Barcoding. *Systematic Biology*, 61, 5: 851–869
- Biomatters. 2012. Geneious version 5.6.5.
<http://www.geneious.com/> (18. jul. 2013)
- Blick T. 2009. Die Spinnen (Araneae) des Naturwaldreservats Goldbachs- und Ziebachsrück (Hessen). V: *Mitteilungen der Hessischen Landesforstverwaltung* 45. Dorow W., Blick T., Kopelke J. (eds.). Wiesbaden, Hessisches Ministerium für Umwelt, Energie, Landwirtschaft und Verbraucherschutz: 326 str.
- Blick T. 2011. Abundant and rare spiders on tree trunks in German forests (Arachnida, Araneae). *Arachnologische Mitteilungen*, 40: 4–14

- Boore J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27: 1767–1780
- Bromham L., Woolfit M., Lee M. S. Y., Rambaut A. 2002. Testing the relationship between morphological and molecular rates of change along phylogenies. *Evolution*, 56: 1921–1930
- Burns J. M., Janzen D. H., Hajibabaei M., Hallwachs W., Hebert P. D. N. 2007. DNA barcodes of closely related (but morphologically and ecologically distinct) species of skipper butterflies (Hesperiidae) can differ by only one to three nucleotides. *Journal of the Lepidopterists' Society*, 61: 138–153
- CBOL. Barcode of Life, identifying species with DNA barcoding. 2013.
<http://www.barcodeoflife.org/> (18. jul. 2013)
- CCDB. The Canadian Centre for DNA Barcoding. Biodiversity Institute of Ontario. 2013.
<http://ccdb.ca/> (18. jul. 2013)
- Clare E. L., Barber B. R., Sweeney B. W., Herbert P. D. N., Fenton M. B. 2011. Eating local: influences of habitat on the diet of little brown bats (*Myotis lucifugus*). *Molecular Ecology*, 20: 1772–1780
- Coddington J. A., Levi H. W. 1991. Systematics and Evolution of Spiders (Araneae). *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22: 565-592
- Costello M. J., Wilson S. P., Houlding B. 2012. Predicting total global species richness using rates of species description and estimates of taxonomic effort. *Systematic Biology*, 61, 5: 871-883
- Costello M. J., May R. M., Stork N. E. 2013. Can We Name Earth's Species Before They Go Extinct? *Science*, 339: 413-416

- Cox A. J., Hebert P. D. N. 2001. Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology*, 10, 2: 371-386
- Crandall K. A., Buhay J. E. 2004. Genomic databases and the tree of life. *Science*, 306: 1144–1145.
- Cruz-Barraza J. A., Carballo J. L., Rocha-Olivares A., Ehrlich H., Hog M. 2012. Integrative taxonomy and molecular phylogeny of genus *Aplysina* (Demospongiae: Verongida) from Mexican Pacific. *PLOS ONE*, 7, 8: e42049
- Dalton D. L., Kotze A. 2011. DNA barcoding as a tool for species identification in three forensic wildlife cases in South Africa. *Forensic Science International*, 207, 1-3: e51-4
- Davies T. J., Savolainen V. 2006. Neutral theory, phylogenies, and the relationship between phenotypic change and evolutionary rates. *Evolution*, 60: 476–483
- Dayrat B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85: 407–415
- Dornelas M., Magurran A., Buckland S., Chao A., Chazdon R., Colwell R., Curtis T., Gaston K., Gotelli N., Kosnik M., McGill B., McCune J., Morlon H., Mumby P., Ovreas L., Studeny A., Vellend M. 2013. Quantifying temporal change in biodiversity: challenges and opportunities. *Proceedings of the Royal Society B: Biological sciences*, 280, 1750: 20121931
- Doyle J. J., Gaut B. S. 2000. Evolution of genes and taxa: a primer. *Plant Molecular Biology*, 42, 1: 1–23
- EZlab, Evolutionary Zoology Lab, Jovan Hadži Institute of Biology, ZRC SAZU, Ljubljana. 2013.
<http://ezlab.zrc-sazu.si/> (18. jul. 2013)

- Fitch W. M., Margoliash E. 1967. The construction of phylogenetic trees. *Science*, 155: 279-284
- Foelix R. F. 2011. *Biology of spiders*. 3rd ed. New York, Oxford University Press: 432 str.
- 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: 294–299
- Foster P. G., Hickey D. A. 1999. Compositional bias may affect both DNA-based and protein-based phylogenetic reconstructions. *Journal of Molecular Evolution*, 48: 284–290
- Gailis M., Kalninš S. 2010. *Biogeography*. Nova Science Publishers, Incorporated, 253 str.
- Gillespie R. G. , Baldwin B. G, Waters J. M., Fraser C. I., Nikula R., Roderick G. K. 2012. Long-distance dispersal: a framework for hypothesis testing. *Trends in Ecology and Evolution*, 27, 1: 47-56
- Goldie X., Lanfear R., Bromham L. 2011. Diversification and the rate of molecular evolution: no evidence of a link in mammals. *Evolutionary Biology*, 11: 286
- GGI. Global genome initiative. National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. 2013.
<http://www.mnh.si.edu/ggi/> (18. jul. 2013)
- Hajibabaei, M. Singer G. A. C., Hickey D. A. 2006a. Benchmarking DNA barcodes: an assessment using available primate sequences. *Genome* 49, 7: 851–854
- Hajibabaei M., Janzen D. H., Burns J. M., Hallwachs W., Hebert P. D. N. 2006b. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 968–971.

- Hajibabaei M., Xia J., Drouin G. 2006c. Seed plant phylogeny: gnetophytes are derived conifers and a sister group to Pinaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 208–217
- Hajibabaei M., Singer G. A. C., Hebert P. D. N., Hickey D. A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23: 167–172
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., deWaard J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society London B*, 270: 313–321
- Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemlak T. S., Francis C. M. 2004a. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*, 2, 10: e312
- Hebert P. D. N., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H., Hallwachs W. 2004b. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 14812–14817
- Hebert P. D. N., Gregory T. R. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology* 54, 5: 852–859
- Hebert P. D. N., deWaard J. R., Landry J. F. 2010. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biology Letters*, 6: 359–362
- Helsdingen P. J. van. 2012. Araneae. V: Fauna Europaea. Database European spiders and their distribution - Distribution - Version 2012.2.
- Hendrich L., Pons J., Ribera I., Balke M. 2010. Mitochondrial *cox1* sequence data reliably uncover patterns of insect diversity but suffer from high lineage-idiosyncratic error rates. *PLoS One*, 5, 12: e14448

- Hendry A. P., Lohmann L. G., Conti E., Cracraft J., Crandall K. A., Faith D. P., Häuser C., Joly C. A., Kogure K., Larigauderie A., Magallón S., Moritz C., Tillier S., Zardoya R., Prieur-Richard A. H., Walther B. A., Yahara T., Donoghue M. J. 2010. Evolutionary biology in biodiversity science, conservation, and policy: a call to action. *Evolution*, 64, 5: 1517–1528
- Hilgenboecker K., Hammerstein P., Schlattmann P., Telschow A., Werren J. H. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*, 281, 2: 215–220
- Hoban S., Vernesi C. 2012. Challenges in global biodiversity conservation and solutions that cross sociology, politics, economics and ecology. *Biology Letters* 8, 6: 897-899
- Huber B. A., Gonzalez A. P. 2001. A new genus of pholcid spider (Araneae, Pholcidae) endemic to western Cuba, with a case of female genitalic dimorphism. *American Museum Novitates*, 3329: 1–23
- Huelsenbeck, J. P. 1995. The performance of phylogenetic methods in simulation. *Systematic Biology*, 44: 17–48
- Hurst G. D. D., Jiggins F. M. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B*, 272: 1525–1534
- IBM Corporation. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp
- iBOL, International Barcode of Life. 2013.
<http://ibol.org/> (18. jul. 2013)

- Johnstone R. A., Hurst G. D. D. 1996. Maternally inherited male-killing microorganisms may confound interpretation of mitochondrial DNA variability. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58, 4: 453–70
- Janecka J., Chowdhary B., Murphy W. 2012. Exploring the correlations between sequence evolution rate and phenotypic divergence across the Mammalian tree will provide insights into adaptive evolution. *Journal of Biosciences*, 37, 5: 897–909
- Kang'ethe E. K., Jones S. J., Patterson R. L. 1982. Identification of the species origin of fresh meat using an enzyme-linked immunosorbent-assay procedure. *Meat science*, 7, 3: 229–240
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 2: 111-120.
- Knowlton N., Weigt L. A. 1998 New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society B*, 265: 2257–2263
- Kolaczkowski B., Thornton J. W. 2004. Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous. *Nature*, 431: 980–984
- Korpelainen H. 2004. The evolutionary processes of mitochondrial and chloroplast genomes differ from those of nuclear genomes. *Naturwissenschaften*, 91, 11: 505–518
- Kumar U. S., Ratheesh R. V., Thomas G., George S. 2012. Use of DNA barcoding in wildlife forensics: a study of sambar deer (*Rusa unicolor*). *Forest Science and Technology*, 8, 4: 224-226
- Kuntner M., Zhang S., Gregorič M., Li D. 2012. *Nephila* female gigantism attained through post-maturity molting. *Journal of Arachnology*, 40, 3: 345–347

- Maddison W. P., Maddison D. R., 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75.
<http://mesquiteproject.org> (18. jul. 2013)
- Mafra I., Ferreira I. M. P. L. V. O, Oliveira M. B. P. P. 2008. Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227, 3: 649–665
- Magnacca K. N., Brown M. J. F. 2010. Mitochondrial heteroplasmy and DNA barcoding in Hawaiian *Hylaeus* (*Nesoprosopis*) bees (Hymenoptera: Colletidae). *BMC Evolutionary Biology*, 10: 174
- May R. 2010. Tropical arthropod species, more or less? *Science*, 329: 41–42
- Meehan C. J., Olson E. J., Reudink M. W., Kyser T. K., Curry R. L. 2009. Herbivory in a spider through exploitation of an ant–plant mutualism *Current Biology*, 19, 19: R892-R893
- Meier R., Shiyang K., Vaidya G., Ng P. K. L. 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, 55, 5: 715-728
- Meyer C. P., Paulay G. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PloS Biology*, 3, 12: e422
- Miller M. A., Pfeiffer W., Schwartz T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. V: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA, 14 Nov. 2010. Str. 1-8
- Milne D. J., Jackling F. C., Sidhu M., Appleton B. R. 2009. Shedding new light on old species identifications: morphological and genetic evidence suggest a need for conservation status review of the critically endangered bat, *Saccolaimus saccolaimus*. *Wildlife Research*, 36: 496–508

- Mora C., Tittensor D. P., Adl S., Simpson A. G. B., Worm B. 2011. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biology*, 9, 8: e1001127
- Moritz C., Cicero C. 2004. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLoS Biology*, 2, 10: e354
- Murphy W. J., Pevzner P. A., O'Brien S. J. 2004. Mammalian phylogenomics comes of age. *Trends in Genetics*, 20, 12: 631-639
- Nekola J. C., White P. S. 1999. The distance decay of similarity in biogeography and ecology. *Journal of Biogeography*, 26, 4: 867–878
- Nentwig W., Blick T., Gloor D., Hänggi A., Kropf C. 2013. Spiders of Europe. www.araneae.unibe.ch (18. jul. 2013)
- Nicolas V., Schaeffer B., Missoup A. D., Kennis J., Colyn M., Denys C., Tatar C., Cruaud C., Laredo C. 2012. Assessment of Three Mitochondrial Genes (16S, Cytb, CO1) for Identifying Species in the Praomyini Tribe (Rodentia: Muridae). *PLoS ONE*, 7, 5: e36586
- Oliveira R., Castro D., Godinho R., Luikart G., Alves P. 2010. Species identification using a small nuclear gene fragment: application to sympatric wild carnivores from South-western Europe. *Conservation Genetics*, 11, 3: 1023–1032
- Padial J. M., De La Riva I. 2007. Integrative taxonomists should use and produce DNA barcodes. *Zootaxa*, 1586: 67-68
- Pagel M. 1999. Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature*, 401: 877–884

- Platnick N. I. 2013. The world spider catalog, version 14.0. American Museum of Natural History.
<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/> (23. jul. 2013)
- Palleroni N. J. 2003. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology*, 149: 1–7
- Parveen I., Singh H. K., Raghuvanshi S., Pradhan U. C., Babbar S. B. 2012. DNA barcoding of endangered Indian *Paphiopedilum* species. *Molecular Ecology Resources*, 12, 1: 82-90
- Pires A. C., Marinoni L. 2010. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotropica*, 10, 2: 339-346
- Pollock, D.D., Zwickl D. J., McGuire J. A., Hillis D. M. 2002. Increased taxon sampling is advantageous for phylogenetic inference. *Systematic Biology*, 51, 4: 664–671
- Prendini L. 2005. Comment on “Identifying spiders through DNA barcodes”. *Canadian Journal of Zoology*, 83, 3: 498–504
- Ratnasingham S., Hebert P. D. N. 2007. bold: The Barcode of Life Data System *Mol Ecol Notes*, 7, 3: 355–364
(<http://www.barcodinglife.org>) (18. jul. 2013)
- Robinson E., Blagoev G., Hebert P. N. D., Adamowicz S. 2009. Prospects for using DNA barcoding to identify spiders in species-rich genera. *ZooKeys*, 16: 27-46
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D. L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M. A., Huelsenbeck J. P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61, 3: 539-542

- Rubinoff D., Cameron S., Will K. 2006. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for "barcoding" identification. *The Journal of heredity*, 97, 6: 581–594
- Saccone C., DeCarla G., Gissi C., Pesole G., Reyes A. 1999. Evolutionary genomics in the Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238: 195–210
- SAS Institute Inc. 2007. JMP Version 7
- Savolainen V., Cowan R. S., Vogler A. P., Roderick G. K. , Lane R. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1805–1811
- Sin W. M., Tam Y. K., Tsui S. K., Ng C. S., Mok C. S., Ha W. Y. 2013. An intergated and validated DNA-based protocol developed to fight against commercial frauds – A case of fraudulent substitutions for deer products. *DNA barcodes*, 1: 27-24
- Singh A. K. 2012. Molecular taxonomy: use of modern methods in the identification of a species. *Indian Journal of Life Sciences*, 2: 143-147
- Slarkin M. 1985. Gene Flow in Natural Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16: 393-430
- Smith M. A., Bertrand C., Crosby K., Eveleigh E. S., Fernandez-Triana J., Fisher B. L., Gibbs J., Hajibabaei M., Hallwachs W., Hind K., Hrcek J., Huang D., Janda M., Janzen D. J., Li Y., Miller S. E., Packer L., Quicke D., Ratnasingham S., Rodriguez J., Rougerie R., Shaw M. R., Sheffield C., Stahlhut J. K., Steinke D., Whitfield J., Wood M., Zhou X. 2012. Wolbachia and DNA Barcoding Insects: Patterns, Potential, and Problems. *PLoS ONE*, 7, 5: e36514

- Smith M. A., Fisher B. L., Hebert P. D. 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1825-1834
- Smith M. A., Woodley N. E., Janzen D. H., Hallwachs W., Hebert P. D. 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) of the United States of America*, 103, 10: 3657-3662
- Stoeckle M. Y., Hebert P. N. D. 2008. Barcode of life. *Scientific American*, 82-88
- Sweeney B. W., Battle J. M., Jackson J. K., Dapkey T. 2011. Can DNA barcodes of stream macroinvertebrates improve descriptions of community structure and water quality? *Journal of the North American Benthological Society*, 30, 1: 195-216
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739
- Tautz D., Arctander P., Minelli A., Thomas R. H., Vogler A. P. 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 2: 70-74
- Tavares E. S., Goncalves P., Miyaki C. Y., Baker A. J. 2011. DNA Barcode Detects High Genetic Structure within Neotropical Bird Species. *PLoS ONE*, 6, 12: e28543
- Valentini A., Pompanon F., Taberlet P. 2008. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 24, 2: 110-117

- Vanhaecke D., Garcia de Leaniz C., Gajardo G., Young K., Sanzana J., Orellana G., Fowler D., Howes P., Monzon-Arguello C., Consuegra S. 2012. DNA Barcoding and Microsatellites Help Species Delimitation and Hybrid Identification in Endangered Galaxiid Fishes. PLoS ONE, 7, 3: e32939
- Veijalainen A., Broad G. R., Wahlberg N., Longino J. T., Sääksjärvi I. E. 2011. DNA barcoding and morphology reveal two common species in one: *Pimpla molesta* stat. rev. separated from *P. croceipes* (Hymenoptera, Ichneumonidae). ZooKeys, 124: 59–70
- Wares J. P., Cunningham C. W. 2001. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. Evolution 55, 12: 2455–2469
- Watson J. D., Baker T. A., Bell S. P., Gann A., Levine M., Losick R. M. 2008. Molecular biology of the gene. San Francisco, Benjamin-Cummings Publishing Company: 841 str.
- Webb J. M., Jacobus L. M., Funk D. H., Zhou X., Kondratieff B., Geraci C. J., DeWalt R. E., Baird D. J., Richard B., Phillips I., Hebert P. D. N. 2012. A DNA Barcode Library for North American Ephemeroptera: Progress and Prospects. PLoS ONE, 7, 5: e38063
- Whitworth T. L., Dawson R. D., Magalon H., Baudry E. 2007. DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). Proceedings of the Royal Society B, 274: 1731–1739
- Wiemers M., Fiedler K. 2007. Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). Frontiers in zoology, 4: 8
- Wiens J. J. 2006. Missing data and the design of phylogenetic analyses. Journal of Biomedical Informatics, 39, 1: 34–42

- Will K. W., Rubinoff D. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*, 20: 47–55
- Will K. W., Mishler B. D., Wheeler Q. D. 2005. The perils of DNA bar-coding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54, 5: 844–851
- Wilson E. O. 2004. Taxonomy as a fundamental discipline. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 359: 739
- Wilson J. J. 2010. Assessing the value of DNA barcodes and other priority gene regions for molecular phylogenetics of Lepidoptera. *PLoS ONE*, 5, 5: e10525
- Wilson J. J. 2011a. Assessing the Value of DNA Barcodes for Molecular Phylogenetics: Effect of Increased Taxon Sampling in Lepidoptera. *PLoS ONE*, 6, 9: e24769
- Wilson J. J. 2011b. Taxonomy and DNA sequence databases: A perfect match? *Terrestrial Arthropod Reviews*, 4: 221–236
- Wright S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28, 2: 114–138
- Yan D., Luo J. Y., Han Y. M., Peng C., Dong X. P., Chen S. L., Sun L. G., Xiao X. H. 2013. Forensic DNA Barcoding and Bio-Response Studies of Animal Horn Products Used in Traditional Medicine. *PLoS ONE*, 8, 2: e55854
- Zhang D. X., Hewitt G. M. 1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial primers in insects. *Insect molecular biology*, 6: 143–150
- Zuckerlandl E., Pauling L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of theoretical biology*, 8, 2: 357–366
- Zwickl D. J., Hillis D. M. 2002. Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error. *Systematic Biology*, 51, 4: 588–598

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju Matjažu Kuntnerju, ki mi je omogočil opravljanje magistrskega dela, me usmerjal pri raziskavah, delil nasvete in poskrbel za vedno dobro vzdušje.

Zahvalil bi se Matjažu Gregoriču, ki je imel 'prste vmes' pri skoraj vseh področjih naloge, Tjaši Lokovšek in Nini Vidergar za pomoč in uvajanje v molekularno delo, Ren-Chun Chengu za pomoč pri podatkih in terenskem delu ter Simoni Kralj-Fišer za pregled statističnih analiz.

Recenzentu Cenetu Fišerju ter predsedniku komisije za zagovor, Roku Kostanjšku, se zahvaljujem za vse popravke in komentarje, ki so nalogo izboljšali tako strokovno kot slovnično.

Zahvala gre tudi vsem, ki so naši raziskovalni skupini omogočili bivanje in terensko delo v Švici, predvsem Christianu Kropfu in prijetni skupnosti Alp Flixa. Hvala tudi Holgerju Fricku, za pregled identifikacij vedno zakompliciranih pajkov iz družine Linyphiidae.

Pri zahvali ne smem spregledati tudi študentov pajkarske skupine, ki so se udeleževali različnih taborov in terenskih dni ter prispevali veliko podatkov, ki smo jih uporabili v tej nalogi. Zahvaljujem se še vsem ostalim, ki so kakorkoli pomagali z nasveti, terenskim in laboratorijskim delom, podatki ali pa le z dolgimi intelektualnimi debatami oz. sproščanjem ob pivu.

Posebna zahvala gre mojemu očetu Igorju za nenehno opominjanje o različnih datumskih rokih, ki mi še danes ne grejo iz glave, ter mami Romani za najboljša kosila, ki so hranila moje možganske celice. Hvala staršem in starim staršem za podporo in finančno pomoč.

Za konec bi se zahvalil še moji puncu Urški Pristovšek, na tej strani pa je premalo prostora, da bi našteval vso njeno pomoč in podporo. Na kratko, brez nje tega magistrskega dela verjetno ne bi bilo.

PRILOGE

Priloga A: Seznam vrst, kode lokacij vzorčenja ter število odraslih samic ter samcev

Takson	Koda lok. Slovenija	Koda lok. Švica	♀	♂
Agelenidae				
<i>Agelena labyrinthica</i>	SI01, SI61		3	1
<i>Allagelena gracilens</i>	SI03, SI04			2
<i>Coelotes terrestris</i>	SI02			1
<i>Histopona torpida</i>	SI59, SI29, SI02, SI39, SI40		6	
<i>Inermocoelotes anoplus</i>	SI59, SI40		3	2
<i>Malthonica silvestris</i>	SI02, SI29		3	
<i>Tegenaria atrica</i>	SI02, SI45, SI62	CH09	2	2
Amaurobiidae				
<i>Amaurobius erberi</i>	SI56, SI41		2	
<i>Amaurobius fenestralis</i>		CH09	1	
<i>Amaurobius ferox</i>	SI50		1	
<i>Amaurobius jugorum</i>	SI01, SI40, SI75		2	
Anyphaenidae				
<i>Anyphaena accentuata</i>	SI50		1	
<i>Anyphaena sabina</i>	SI41		1	
Araneidae				
<i>Aculepeira ceropegia</i>	SI61	CH06, CH09, CH17, CH19, CH 23, CH32	7	3
<i>Agalenatea redii</i>	SI38, SI43		3	
<i>Araneus alsine</i>	SI61			1
<i>Araneus angulatus</i>	SI52, SI63, SI19		3	1
<i>Araneus diadematus</i>	SI64, SI40, SI50	CH04	8	1
<i>Araneus marmoreus</i>	SI12, SI39, SI50, SI65, SI76		5	
<i>Araneus quadratus</i>	SI44, SI46	CH23, CH30, CH32	2	4
<i>Araneus sturmi</i>	SI41, SI61		1	1
<i>Araniella cucurbitina</i>	SI41, SI50, SI58, SI64		1	4
<i>Araniella displicata</i>		CH32	1	
<i>Argiope bruennichi</i>	SI04, SI40, SI50, SI61		7	1
<i>Cercidia prominens</i>	SI41, SI52, SI55, SI56, SI60		4	3
<i>Cyclosa conica</i>	SI40	CH01	2	
<i>Gibbaranea bituberculata</i>	SI41, SI43, SI52, SI60		7	1
<i>Hypsosinga albovittata</i>		CH08	1	
<i>Hypsosinga pygmaea</i>	SI20, SI26		2	
<i>Hypsosinga sanguinea</i>	SI57	CH11	3	2
<i>Larinioides sclopetarius</i>	SI49, SI66	CH15	3	2
<i>Leviellus thorelli</i>	SI16, SI50, SI65		4	

se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga A: Seznam vrst, kode lokacij vzorčenja ter število odraslih samic ter samcev

Takson	Koda lok. Slovenija	Koda lok. Švica	♀	♂
<i>Mangora acalypha</i>	SI28, SI41, SI50, SI52, SI53, SI55, SI56, SI60, SI61, SI67		15	10
<i>Neoscona adianta</i>	SI53		1	
<i>Nuctenea umbratica</i>	SI50, SI68	CH10, CH12	4	2
<i>Parazygiella montana</i>	SI42	CH01, CH06, CH10, CH23	7	1
<i>Singa nitidula</i>	SI33			1
<i>Stroemiellus stroemi</i>	SI48		2	
<i>Zilla diodia</i>	SI41, SI58, SI60		7	1
<i>Zygiella x-notata</i>		CH33	1	
Atypidae				
<i>Atypus piceus</i>	SI40, SI69		3	
Clubionidae				
<i>Clubiona germanica</i>	SI18		1	
<i>Clubiona kulczynskii</i>		CH05	1	
<i>Clubiona neglecta</i>	SI61		1	
<i>Clubiona pseudoneglecta</i>	SI25		2	
<i>Clubiona reclusa</i>		CH17, CH23, CH30		4
<i>Clubiona terrestris</i>	SI02, SI58, SI61		1	2
Corinnidae				
<i>Phrurolithus festivus</i>	SI06		1	
<i>Phrurolithus minimus</i>	SI15		1	
Dictynidae				
<i>Argenna subnigra</i>	SI24		1	
<i>Cicurina cicur</i>	SI15		1	
<i>Dictyna arundinacea</i>		CH20, CH21, CH23	3	
<i>Dictyna civica</i>	SI16		1	
<i>Dictyna uncinata</i>	SI37		1	1
<i>Lathys humilis</i>	SI56		1	
<i>Lathys nielseni</i>	SI41		1	
Dysderidae				
<i>Dasumia canestrinii</i>	SI40, SI59, SI70		2	5
<i>Dysdera adriatica</i>	SI12		1	1
<i>Dysdera erythrina</i>	SI08		1	
<i>Dysdera ninnii</i>	SI56		4	1
Filistatidae				
<i>Filistata insidiatrix</i>	SI41		2	
Gnaphosidae				
<i>Aphantaulax cincta</i>	SI52			1
<i>Callilepis schuszteri</i>	SI41		3	2
<i>Drassodes lapidosus</i>	SI58, SI61		2	
<i>Drassodes pubescens</i>	SI20		1	
<i>Drassyllus villicus</i>	SI41		2	1
<i>Gnaphosa bicolor</i>	SI12		2	
<i>Haplodrassus silvestris</i>	SI55		1	

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga A: Seznam vrst, kode lokacij vzorčenja ter število odraslih samic ter samcev

Takson	Koda lok. Slovenija	Koda lok. Švica	♀	♂
<i>Micaria pulicaria</i>	SI24		1	
<i>Micaria aenea</i>		CH17	1	
<i>Nomisias extornata</i>	SI41		1	
<i>Phaeoedus braccatus</i>	SI61			1
<i>Scotophaeus scutulatus</i>	SI50		1	1
<i>Trachyzelotes pedestris</i>	SI46		1	
<i>Zelotes apricorum</i>	SI71		1	
<i>Zelotes latreillei</i>	SI05, SI33		1	1
<i>Zelotes subterraneus</i>		CH27	2	
Hahniidae				
<i>Antistea elegans</i>		CH05	3	
<i>Hahnia difficilis</i>		CH03	2	
Linyphiidae				
<i>Agnyphantes expunctus</i>		CH16, CH23, CH32	11	17
<i>Agyneta cauta</i>		CH09, CH25	6	
<i>Agyneta conigera</i>		CH02		1
<i>Bolyphantes alticeps</i>		CH31	1	
<i>Bolyphantes luteolus</i>		CH13, CH31	2	
<i>Caracladus avicula</i>		CH24, CH32	5	1
<i>Caracladus zamoniensis</i>		CH03	1	
<i>Centromerus pabulator</i>		CH12, CH21, CH26	5	
<i>Centromerus subalpinus</i>		CH21, CH31	2	
<i>Ceratinella brevipes</i>		CH32		1
<i>Diplocephalus crassilobus</i>	SI17			1
<i>Diplocephalus latifrons</i>		CH03		1
<i>Diplostyla concolor</i>	SI02		1	
<i>Drapetisca socialis</i>	SI02, SI39		3	1
<i>Entelecara acuminata</i>	SI61	CH09	1	1
<i>Erigone atra</i>		CH02, CH19, CH30		3
<i>Erigone dentigera</i>		CH25	1	
<i>Erigone dentipalpis</i>		CH12, CH30		3
<i>Erigone remota</i>		CH19		1
<i>Erigone svenssoni</i>		CH05	1	
<i>Erigonella ignobilis</i>		CH05	2	
<i>Floronia bucculenta</i>	SI05		1	
<i>Frontinellina frutetorum</i>	SI41, SI52, SI55, SI56		12	6
<i>Gonatium hilare</i>	SI41			1
<i>Gonatium rubellum</i>		CH23	2	
<i>Gonatium rubens</i>		CH13, CH25, CH31	3	1
<i>Improphantes nitidus</i>		CH28	1	
<i>Incestophantes frigidus</i>		CH06, CH08	3	
<i>Kaestneria dorsalis</i>	SI39		1	
<i>Lepthyphantes leprosus</i>	SI34	CH18	2	
<i>Lepthyphantes minutus</i>	SI07		1	
<i>Lepthyphantes nodifer</i>		CH03, CH17, CH28	15	1
<i>Leptorhoptrum robustum</i>		CH14		1

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga A: Seznam vrst, kode lokacij vzorčenja ter število odraslih samic ter samcev

Takson	Koda lok. Slovenija	Koda lok. Švica	♀	♂
<i>Linyphia hortensis</i>	SI59	CH09	2	
<i>Linyphia triangularis</i>	SI01, SI30, SI39, SI61, SI69		5	5
<i>Macrargus rufus</i>		CH03	2	
<i>Mansuphantes fragilis</i>		CH16, CH28	2	
<i>Maso sundevalli</i>	SI61	CH05, CH09, CH17, CH28, CH30, CH31	7	11
<i>Mecynargus foveatus</i>	SI26		1	
<i>Megalephyphantes collinus</i>	SI40		1	
<i>Megalephyphantes nebulosus</i>		CH17, CH23	5	
<i>Meioneta affinis</i>		CH15	1	1
<i>Meioneta alpica</i>		CH19		1
<i>Meioneta fuscipalpa</i>	SI26	CH25, CH31	3	
<i>Meioneta gulosa</i>		CH27		1
<i>Meioneta innotabilis</i>		CH03		1
<i>Meioneta orites</i>		CH09, CH25	3	
<i>Meioneta rurestris</i>	SI48, SI61	CH06, CH09, CH25	5	3
<i>Meioneta saxatilis?</i>	SI23		1	
<i>Meioneta similis</i>		CH19	1	
<i>Meioneta simplicitarsis</i>	SI26		5	
<i>Mermessus trilobatus</i>	SI48, SI61		1	1
<i>Metopobactrus prominulus</i>		CH23	2	
<i>Micrargus alpinus</i>		CH03, CH28, CH30, CH31	4	
<i>Micrargus herbigradus</i>	SI15		1	
<i>Microctenonyx subitaneus</i>		CH25		1
<i>Microlinyphia pusilla</i>		CH05, CH06, CH12, CH20, CH23, CH30	7	1
<i>Minicia marginella</i>	SI52, SI56, SI61	CH02, CH13	7	7
<i>Minyriolus pusillus</i>		CH03, CH21, CH26, CH31	15	1
<i>Moebelia penicillata</i>	SI61			4
<i>Mughiphantes cornutus</i>		CH16, CH22, CH32	6	2
<i>Mughiphantes mughi</i>		CH21, CH23, CH24, CH31, CH32	10	5
<i>Nematogmus sanguinolentus</i>	SI38, SI41, SI43, SI55, SI56, SI57, SI60, SI61	CH11	17	7
<i>Neriere clathrata</i>	SI14, SI56	CH09, CH15, CH23	4	2
<i>Neriere furtiva</i>	SI41, SI52, SI53, SI55, SI56, SI57		14	7
<i>Neriere peltata</i>	SI41	CH02	2	1
<i>Neriere radiata</i>	SI41	CH27	2	
<i>Obscuriphantes obscurus</i>		CH03, CH23	2	
<i>Oedothorax gibbifer</i>		CH25	1	
<i>Ostearius melanopygius</i>	SI46		1	
<i>Palliduphantes pallidus</i>		CH03, CH28	1	1

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga A: Seznam vrst, kode lokacij vzorčenja ter število odraslih samic ter samcev

Takson	Koda lok. Slovenija	Koda lok. Švica	♀	♂
<i>Panamomops tauricornis</i>		CH26	11	8
<i>Pelecopsis elongata</i>	SI61		1	
<i>Pelecopsis mengei</i>		CH22, CH24	2	
<i>Pelecopsis raditicola</i>		CH12, CH16, CH21, CH22, CH23, CH24, CH28, CH30, CH31, CH32	33	9
<i>Pityohyphantes phrygianus</i>		CH20, CH23	6	3
<i>Pocadicnemis juncea</i>		CH06, CH15	2	
<i>Pocadicnemis pumila</i>	SI61	CH02, CH05, CH11, CH12, CH25, CH27	19	2
<i>Porrhomma pallidum</i>		CH12	1	
<i>Porrhomma pygmaeus</i>	SI17			1
<i>Scotinotylus alpigena</i>		CH26, CH32	6	
<i>Scotinotylus clavatus</i>		CH26		1
<i>Silometopus elegans</i>		CH20	1	
<i>Tapinocyba affinis</i>		CH26	3	1
<i>Tenuiphantes alacris</i>		CH03, CH23, CH31	4	4
<i>Tenuiphantes cristatus</i>		CH03, CH16	4	1
<i>Tenuiphantes flavipes</i>	SI01, SI39	CH16, CH27	2	6
<i>Tenuiphantes jacksoni</i>		CH21	3	1
<i>Tenuiphantes jacksonoides</i>		CH12, CH22, CH23, CH28	12	8
<i>Tenuiphantes mengei</i>		CH01, CH02, CH05, CH06, CH09, CH12, CH13, CH16, CH17, CH23, CH24, CH25, CH28, CH30, CH31	46	22
<i>Tenuiphantes tenebricola</i>		CH03, CH16, CH17, CH24, CH24, CH28, CH31	30	15
<i>Tenuiphantes tenuis</i>	SI48, SI61		1	1
<i>Theonina cornix</i>	SI23			1
<i>Tiso aestivus</i>		CH07		2
<i>Tiso vagans</i>		CH06, CH09, CH11, CH13, CH22, CH23, CH24	1	11
<i>Troglohyphantes sp.</i>		CH18	3	
<i>Walckenaeria antica</i>		CH30	1	
<i>Walckenaeria furcillata</i>		CH11	1	
Liocranidae				
<i>Agroeca brunnea</i>	SI61		1	1
<i>Liocranum rupicola</i>	SI50		1	
Lycosidae				
<i>Alopecosa accentuata</i>		CH25	1	
<i>Alopecosa aculeata</i>		CH23	1	
<i>Alopecosa pulverulenta</i>	SI38, SI43, SI52, SI60	CH30, CH31, CH32	5	10

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga A: Seznam vrst, kode lokacij vzorčenja ter število odraslih samic ter samcev

Takson	Koda lok. Slovenija	Koda lok. Švica	♀	♂
<i>Alopecosa sulzeri</i>	SI58		1	
<i>Alopecosa trabalis</i>	SI53, SI61		3	
<i>Arctosa fulvolineata</i>	SI30			1
<i>Arctosa lutetiana</i>	SI01		1	
<i>Arctosa maculata</i>	SI27		1	
<i>Aulonia albimana</i>	SI61		1	6
<i>Hogna radiata</i>	SI50, SI68		1	1
<i>Pardosa agrestis</i>	SI04		1	
<i>Pardosa amentata</i>	SI35	CH05, CH14, CH20, CH21, CH25, CH30	22	5
<i>Pardosa bifasciata</i>	SI57	CH08	1	1
<i>Pardosa blanda</i>		CH08, CH20, CH21, CH25	12	6
<i>Pardosa ferruginea</i>		CH32	1	
<i>Pardosa hortensis</i>	SI13		1	
<i>Pardosa hyperborea</i>		CH14	1	
<i>Pardosa lugubris</i>	SI15, SI38, SI40, SI58, SI59, SI60, SI61	CH11, CH12, CH15, CH27	31	5
<i>Pardosa oreophila</i>		CH10, CH13	1	4
<i>Pardosa palustris</i>	SI61	CH10, CH15, CH19	4	2
<i>Pardosa proxima</i>	SI05		1	
<i>Pardosa riparia</i>	SI53, SI61	CH01, CH02, CH05, CH06, CH20, CH23, CH24, CH25, CH30, CH31	60	22
<i>Pirata piraticus</i>		CH20, CH31		2
<i>Piratula hygrophila</i>	SI14		1	
<i>Piratula knorri</i>	SI14, SI27		2	
<i>Trochosa spinipalpis</i>	SI30		2	
<i>Xerolycosa nemoralis</i>		CH27	2	1
Mimetidae				
<i>Ero furcata</i>		CH03		1
Miturgidae				
<i>Cheiracanthium erraticum</i>	SI22		1	
<i>Cheiracanthium mildei</i>	SI46			1
<i>Cheiracanthium punctorium</i>	SI11, SI40		4	1
Nemesiidae				
<i>Nemesia pannonica</i>	SI09		1	
Nesticidae				
<i>Nesticus cellulanus</i>	SI10		1	
Oecobiidae				
<i>Uroctea durandi</i>	SI41		1	
Philodromidae				
<i>Philodromus albidus</i>	SI61		2	
<i>Philodromus aureolus</i>	SI61		1	
<i>Philodromus cespitum</i>	SI04	CH31	2	

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga A: Seznam vrst, kode lokacij vzorčenja ter število odraslih samic ter samcev

Takson	Koda lok. Slovenija	Koda lok. Švica	♀	♂
<i>Philodromus dispar</i>	SI59		1	
<i>Philodromus praedatus</i>	SI41	CH15		2
<i>Philodromus pulchellus</i>	SI41		5	
<i>Philodromus vagulus</i>		CH19, CH29	2	
<i>Thanatus formicinus</i>	SI52		1	
<i>Tibellus macellus</i>	SI41, SI52		3	4
<i>Tibellus oblongus</i>	SI55		1	
Pholcidae				
<i>Pholcus opilionoides</i>	SI10, SI13		1	1
<i>Pholcus phalangoides</i>	SI50, SI68		2	1
<i>Psilochorus simoni</i>	SI50		1	
Pisauridae				
<i>Pisaura mirabilis</i>	SI38, SI41, SI43, SI53, SI58, SI60, SI61	CH06	7	12
Salticidae				
<i>Evarcha arcuata</i>	SI01, SI38, SI39, SI40, SI43, SI52, SI53, SI56, SI60, SI61	CH23, CH30	21	13
<i>Evarcha falcata</i>	SI01, SI39, SI55, SI56, SI61		5	3
<i>Evarcha jucunda</i>	SI41			1
<i>Evarcha laetabunda</i>	SI38, SI52, SI53, SI56		9	3
<i>Evarcha michailovi</i>	SI52			1
<i>Hasarius adansoni</i>	SI51			1
<i>Heliophanus aeneus</i>	SI21		1	
<i>Heliophanus auratus</i>	SI21			1
<i>Heliophanus cupreus</i>	SI38, SI41, SI52, SI53, SI55, SI56, SI57, SI60, SI61	CH12	21	21
<i>Heliophanus flavipes</i>	SI20, SI38, SI43, SI61		7	1
<i>Heliophanus kochii</i>	SI41			1
<i>Icius subinermis</i>	SI50, SI51		2	1
<i>Leptorchetes berlinensis</i>	SI50			1
<i>Macaroeris nidicolens</i>	SI41, SI46		2	1
<i>Marpissa muscosa</i>	SI39			1
<i>Marpissa nivoyi</i>	SI41, SI52, SI56		6	4
<i>Myrmarachne formicaria</i>	SI33		1	
<i>Neon reticulatus</i>	SI04		1	
<i>Pellenes seriatus</i>	SI38, SI52, SI53, SI55		3	1
<i>Pellenes tripunctatus</i>	SI56			1
<i>Philaeus chrysops</i>	SI25, SI53		1	1
<i>Pseudeuophrys lanigera</i>	SI50		1	
<i>Saitis barbipes</i>	SI41, SI56, SI59		7	8
<i>Salticus scenius</i>	SI33, SI48	CH18	2	1
<i>Sibianor aurocinctus</i>		CH12		3
<i>Sitticus rupicola</i>		CH01, CH23, CH25	2	3

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga A: Seznam vrst, kode lokacij vzorčenja ter število odraslih samic ter samcev

Takson	Koda lok. Slovenija	Koda lok. Švica	♀	♂
Scytodidae				
<i>Scytodes thoracica</i>	SI41, SI50		1	1
Segestriidae				
<i>Segestria senoculata</i>	SI11, SI21		2	
Sparassidae				
<i>Micrommata virescens</i>	SI38, SI52, SI55, SI56, SI58, SI60, SI61	CH05, CH23, CH25, CH32	5	10
Tetragnathidae				
<i>Meta menardi</i>	SI31		1	
<i>Metellina mengei</i>		CH17, CH25, CH31	4	1
<i>Metellina merianae</i>	SI01, SI29	CH02	5	1
<i>Metellina segmentata</i>	SI36, SI50		1	2
<i>Pachygnatha degeeri</i>	SI05	CH12, CH15		7
<i>Pachygnatha listeri</i>	SI14	CH15	1	1
<i>Tetragnatha extensa</i>	SI61		1	
<i>Tetragnatha nigrata</i>	SI39		2	1
<i>Tetragnatha pinicola</i>	SI61	CH09		2
Theridiidae				
<i>Asagena phalerata</i>	SI46		1	
<i>Crustulina guttata</i>	SI56, SI57			2
<i>Crustulina scabripes</i>	SI41			2
<i>Dipoena melanogaster</i>	SI41		1	
<i>Enoplognatha afrodite</i>	SI41		2	
<i>Enoplognatha latimana</i>	SI72	CH09		2
<i>Enoplognatha ovata</i>	SI04, SI39, SI61	CH09, CH11, CH12, CH15	17	10
<i>Episinus angulatus</i>	SI18			1
<i>Episinus maculipes</i>	SI41		1	
<i>Episinus truncatus</i>	SI04, SI41	CH11, CH27	7	2
<i>Euryopsis flavomaculata</i>	SI54			1
<i>Heterotheridion nigrovariegatum</i>	SI41, SI50		3	1
<i>Neottiura bimaculata</i>	SI53, SI61	CH09	8	4
<i>Neottiura herbigrada</i>	SI55			1
<i>Neottiura suaveolens</i>	SI26, SI61		6	
<i>Paidiscura pallens</i>	SI61		2	
<i>Parasteatoda lunata</i>	SI01, SI40, SI41, SI59		6	1
<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	SI10, SI39, SI46, SI50, SI61		6	1
<i>Phylloneta impressa</i>		CH01, CH12, CH15, CH17, CH19, CH20, CH23, CH30	22	6
<i>Phylloneta sisyphia</i>		CH03, CH05, CH09, CH17, CH18, CH23, CH27	9	2
<i>Platnickina tincta</i>	SI15, SI61		1	1
<i>Robertus lividus</i>		CH18, CH24	1	1

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga A: Seznam vrst, kode lokacij vzorčenja ter število odraslih samic ter samcev

Takson	Koda lok. Slovenija	Koda lok. Švica	♀	♂
<i>Robertus mediterraneus</i>		CH15		1
<i>Robertus scoticus</i>	SI21		1	
<i>Robertus truncorum</i>		CH26, CH31	1	1
<i>Sardinidion blackwalli</i>	SI28, SI73		1	1
<i>Simitidion simile</i>	SI41, SI52			3
<i>Steatoda bipunctata</i>	SI10, SI39, SI46, SI65	CH18	6	1
<i>Steatoda triangulosa</i>	SI32, SI50, SI51, SI74		2	6
<i>Theridion betteni</i>		CH01	1	
<i>Theridion pinastri</i>	SI41, SI61		1	2
<i>Theridion varians</i>	SI39, SI48, SI61		1	2
Thomisidae				
<i>Diaea livens</i>	SI43			1
<i>Ebrechtella tricuspidata</i>	SI28, SI39			4
<i>Heriaeus hirtus</i>	SI55			1
<i>Misumena vatia</i>	SI19, SI38, SI43, SI50, SI60, SI61		5	4
<i>Ozyptila atomaria</i>		CH25		1
<i>Ozyptila claveata</i>	SI56			1
<i>Ozyptila trux</i>		CH05		1
<i>Synema globosum</i>	SI60	CH15	1	2
<i>Thomisus onustus</i>	SI38, SI57		2	5
<i>Tmarus piger</i>	SI38, SI55, SI58, SI59		4	1
<i>Xysticus acerbus</i>	SI60		1	
<i>Xysticus audax</i>	SI38, SI43		2	
<i>Xysticus bifasciatus</i>	SI61			1
<i>Xysticus cristatus</i>	SI61	CH19		2
<i>Xysticus desidosus</i>	SI38		1	
<i>Xysticus erraticus</i>	SI25			1
<i>Xysticus kempeleni</i>	SI38, SI60		2	
<i>Xysticus kochi</i>	SI38, SI43, SI53, SI60			4
<i>Xysticus lanio</i>	SI41		1	
<i>Xysticus lineatus</i>	SI61			2
<i>Xysticus macedonicus</i>		CH02		1
<i>Xysticus tenebrosus</i>	SI41			3
Titanoecidae				
<i>Titanoeca tristis</i>	SI11		1	
Uloboridae				
<i>Hyptiotes paradoxus</i>	SI08, SI39		3	
<i>Uloborus plumipes</i>	SI47		4	
<i>Uloborus walckenaerius</i>	SI55			
Zoridae				
<i>Zora spinimana</i>	SI56, SI61	CH02, CH05, CH24, CH31	7	2

Priloga B: Detajlni podatki o lokacijah vzorčenja

Koda lokacije	Lokacija	Lat.	Lon.	Datum	Nabrali
SLOVENIJA					
SI01	Biš	46,53738	15,89630	22.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI02	Hrastovec	46,56125	15,79527	22.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI03	Cerkvenjak	46,56937	15,94805	22.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI04	Cerkvenjak	46,56412	15,98627	22.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI05	Sv. Jurij ob Ščavnici	46,55090	16,04513	22.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI06	Čelje	45,59811	14,14648	21.vii.2012	Kostanjšek, RTŠB
SI07	Ljutomer	46,52718	16,20495	22.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI08	Ribnica, Pivka	45,63330	14,13923	21.vii.2012	Kostanjšek, RTŠB
SI09	Divača	45,67838	13,99522	22.vii.2012	Kostanjšek, RTŠB
SI10	Sv. Jurij ob Ščavnici	46,55728	16,03857	25.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI11	Divača	45,68349	14,01655	22.vii.2012	Kostanjšek, RTŠB
SI12	Divača	45,67883	14,04374	22.vii.2012	Kostanjšek, RTŠB
SI13	Čepno	45,67351	14,10677	22.vii.2012	Kostanjšek, RTŠB
SI14	Spodnji Velovlek	46,47685	15,93157	25.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI15	Apače	46,68040	15,89883	26.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI16	Apače	46,69538	15,90873	26.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI17	Novokračine	45,49150	14,30186	22.vii.2012	Kostanjšek, RTŠB
SI18	Podgorje	46,71828	15,82427	26.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI19	Ptujska cesta	46,62825	15,99732	26.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI20	Dragotinci	46,58848	16,02970	27.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI21	Jurišče	45,67351	14,30931	23.vii.2012	Kostanjšek, RTŠB
SI22	Polenšak	46,46992	16,02268	29.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI23	Šembije	45,60673	14,24100	26.vii.2012	Kostanjšek, RTŠB
SI24	Zagorje	45,64130	14,23835	26.vii.2012	Kostanjšek, RTŠB
SI25	Dolnja Košana	45,66461	14,13501	27.vii.2012	Kostanjšek, RTŠB
SI26	Dolnja Košana	45,65865	14,13974	21.vii.2012	Kostanjšek, RTŠB
SI27	Buje	45,63999	14,08746	20.vii.2012	Kostanjšek, RTŠB

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga B: Detaljni podatki o lokacijah vzorčenja

Koda lokacije	Lokacija	Lat.	Lon.	Datum	Nabrali
SI28	Bistra	45,94749	14,33690	17.v.2011	Čandek
SI29	Gradišče pri Lukovici, Gradiško jezero	46,16258	14,71267	6.x.2011	Čandek
SI30	Ig, Iški Vintgar	45,90897	14,49553	31.vii.2011	Čandek
SI31	Kranj, Tular cave	46,23586	14,34903	4.ix.2010	Aljančič
SI32	Ljubljana	46,08037	14,46898	31.vii.2010	Rozman
SI33	Ljubljana, Biotechnical faculty	46,05127	14,47000	9.v.2012	Čandek
SI34	Ljubljana, castle	46,04938	14,50982	8.ix.2011	Čandek, Šiling
SI35	Menina planina	46,25270	14,83250	7.viii.2011	Čandek, Pristovšek
SI36	Močilnik	45,95470	14,29250	2.x.2011	Kuntner
SI37	Podpeč, Brezovica	45,97491	14,41922	17.v.2011	Čandek
SI38	Poreče	45,81882	13,96924	8.v.2011	Čandek
SI39	Primostek	45,62986	15,29969	24.viii.2010	Kuntner, Gregorič, Lokovšek
SI40	Slavnik	45,54991	13,96194	26.viii.2010	Kuntner, Lokovšek
SI41	Socerb, Osp	45,58194	13,85578	7.vi.2012	Kuntner, Gregorič, Čandek, Kralj-Fišer, Cheng
SI42	Srednja vas, Bohinj	46,34575	13,92319	28.ix.2010	Kuntner
SI43	Vipava	45,82822	13,95939	8.v.2011	Čandek
SI44	Vnanje Gorice, Brezovica pri Ljubljani	46,00279	14,43416	10.ix.2010	Gregorič
SI45	Vrh nad Želimljami, Škofljica	45,90907	14,59344	12.ix.2010	Kuntner
SI46	Šešče pri Preboldu	46,23564	15,12276	13.vi.2011 - 22.vi.2012	Čandek, Pristovšek
SI47	Ljubljana, center	46,03956	14,51472	16.vii.2012	Gregorič
SI48	Ljubljana, center	46,04338	14,50406	24.v.2011 - 19.vi.2012	Gregorič, Kuntner
SI49	Ljubljana, center	46,05158	14,51070	25.viii.2011	Čandek
SI50	Sp. Prapreče	46,16199	14,69334	3.viii.2010 - 28.5.2012	Kuntner
SI51	Ljubljana, Nove Jarše	46,07119	14,54031	10.vi.2011 - 31.viii.2011	Čandek, Pristovšek

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga B: Detaljni podatki o lokacijah vzorčenja

Koda lokacije	Lokacija	Lat.	Lon.	Datum	Nabrali
SI52	Dinaric Karst, Griže	45,75060	13,95090	4.iv.2011 - 21.vi.2011	Gregorič, Čandek
SI53	Dinaric Karst, Griže	45,75480	13,94950	10.v.2011 - 21.vi.2011	Gregorič, Čandek
SI54	Dinaric Karst, Griže	45,75100	13,95040	10.v.2011	Gregorič, Čandek
SI55	Dinaric Karst, Lokvice	45,86590	13,61020	4.iv.2011 - 10.v.2011	Gregorič, Čandek
SI56	Dinaric Karst, Novelo	45,85330	13,65520	4.iv.2011 - 10.v.2011	Gregorič, Čandek
SI57	Dinaric Karst, Novelo	45,84820	13,65840	10.v.2011	Gregorič, Čandek
SI58	Budanje	45,87430	13,94969	7.v.2011	Čandek
SI59	Budanje	45,87972	13,94684	7.v.2011	Čandek
SI60	Budanje	45,87989	13,94593	7.v.2011	Čandek
SI61	Sekirišče	45,86315	14,53671	23. vi. 2011 - 21.vi.2012	Čandek
SI62	Kranj	46,24821	14,35908	30.iii.2011	Aljančič
SI63	Avče	46,10878	13,68193	29.vii.2010	Kuntner
SI64	Polenšak	46,47232	16,01817	29.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI65	Dramlje	46,27995	15,40441	27.viii.2011	Čandek, Pristovšek
SI66	Kremenica, Ig	45,94147	14,54803	13.ix.2010	Gregorič
SI67	Sv. Jurij ob Ščavnici	46,55780	16,03953	25.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI68	Sv. Jurij ob Ščavnici	46,56873	16,02227	22.vii.2011	Kostanjšek, RTŠB
SI69	Lipalca	46,01015	14,31158	26.i.2012	Kuntner
SI70	Dinaric Karst, Lokvice	45,86140	13,59030	10.v.2011	Gregorič, Čandek
SI71	Divča	45,67838	13,99522	22.vii.2012	Kostanjšek, RTŠB
SI72	Dolnja Košana	45,65785	14,13841	21.vii.2012	Kostanjšek, RTŠB
SI73	Ljubljana, Galjevica	46,03515	14,52111	31.v.2011	Kuntner
SI74	Brezovica pri Ljubljani	46,01544	14,41191	18.viii.2010	Gregorič
SI75	Buje	45,65431	14,09236	20.vii.2012	RTŠB 2012
SI76	Velovlek	46,49420	15,91743	25.vii.2011	RTŠB 2011
ŠVICA					
CH01	Bernese Alps, Gasteretal	46,44572	7,74133	7.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga B: Detaljni podatki o lokacijah vzorčenja

Koda lokacije	Lokacija	Lat.	Lon.	Datum	Nabrali
CH02	Bernese Alps, Gasteretal	46,44858	7,74383	7.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH03	Bernese Alps, Gasteretal	46,44975	7,71350	7.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH04	Bernese Alps, Gasteretal	46,45525	7,70387	7.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH05	Bernese Alps, Gasteretal	46,46735	7,66405	7.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH06	Bernese Alps, Kandersteg	46,50200	7,69917	7.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH07	Bernese Alps, Rothorn	46,02073	7,79885	8.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH08	Bernese Alps, Rothorn	46,01828	7,76867	8.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH09	Pennine Alps, Mattertal	46,09763	7,77888	8.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH10	Bernese Alps, Kleine Scheidegg	46,58533	7,96063	9.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH11	Bernese Alps, Lake Brienz	46,75690	8,01068	10.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH12	Bernese Alps, Nesselental	46,72127	8,30385	10.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH13	Bernese Alps, Sustenpass	46,73295	8,43245	10.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH14	Glarus Alps, Oberalppass	46,66172	8,67188	10.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH15	Glarus Alps, near Affeier	46,76058	9,09328	10.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH16	Engadin, Silvaplana	46,46668	9,79462	11.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH17	Engadin, Bivio	46,47535	9,64688	11.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH18	Grison Alps, Alp Flix, Salategnas	46,51658	9,65225	12.vii.- 19.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH19	Grison Alps, Alp Flix, Salategnas	46,51725	9,65333	12.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH20	Grison Alps, Alp Flix, Salategnas	46,51807	9,64798	12.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH21	Grison Alps, Alp Flix, Salategnas	46,51938	9,64898	12.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH22	Grison Alps, Alp Flix, Salategnas	46,51515	9,64655	12.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH23	Grison Alps, Alp Flix, Salategnas	46,51408	9,64480	12.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga B: Detaljni podatki o lokacijah vzorčenja

Koda lokacije	Lokacija	Lat.	Lon.	Datum	Nabrali
CH24	Grison Alps, Alp Flix, Salategnas	46,51313	9,64300	12.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH25	Grison Alps, Alp Flix, Salategnas	46,51588	9,64955	16.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH26	Grison Alps, Alp Flix, Salategnas	46,51665	9,65158	14.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH27	Grison Alps, road to Davos	46,68081	9,65574	15.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH28	Grison Alps, Alp Flix, Salategnas	46,51647	9,63874	15.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH29	Grison Alps, Alp Flix - Lai Flix	46,53402	9,64307	16.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH30	Grison Alps, Alp Flix - Lai Flix	46,53578	9,64093	16.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH31	Grison Alps, Alp Flix - Lai Flix	46,53430	9,63748	16.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH32	Grison Alps, Alp Flix, Salategnas	46,52030	9,64580	16.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek
CH33	Interlaken	46,44572	7,74133	10.vii.2011	Kuntner, Gregorič, Čandek

Priloga C: Uporabljeni podatki za testiranje obstoja vrzeli med črtnimi kodami DNA

Takson	Kategorija	Povprečna K2P razdalja	Št. vrst	Št. osebkov
<i>Megaleptyphantes</i>	Rod	0,19570	2	n/a
<i>Leptyphantes</i>	Rod	0,18388	2	n/a
<i>Pocadicnemis</i>	Rod	0,17964	2	n/a
<i>Mughiphantes</i>	Rod	0,16841	2	n/a
<i>Araneus</i>	Rod	0,15713	6	n/a
<i>Metellina</i>	Rod	0,15612	3	n/a
<i>Marpissa</i>	Rod	0,15164	2	n/a
<i>Dysdera</i>	Rod	0,14922	3	n/a
<i>Linyphia</i>	Rod	0,14242	2	n/a
<i>Steatoda</i>	Rod	0,13553	2	n/a
<i>Arctosa</i>	Rod	0,13514	2	n/a
<i>Hypsosinga</i>	Rod	0,12999	3	n/a
<i>Tiso</i>	Rod	0,12992	2	n/a
<i>Dictyna</i>	Rod	0,12948	3	n/a
<i>Neriene</i>	Rod	0,12613	4	n/a
<i>Micaria</i>	Rod	0,12438	2	n/a
<i>Centromerus</i>	Rod	0,12383	2	n/a
<i>Theridion</i>	Rod	0,12234	3	n/a
<i>Crustulina</i>	Rod	0,12060	2	n/a
<i>Agyneta</i>	Rod	0,11031	2	n/a
<i>Tetragnatha</i>	Rod	0,10796	3	n/a
<i>Cheiracanthium</i>	Rod	0,10698	3	n/a
<i>Amaurobius</i>	Rod	0,10685	4	n/a
<i>Porrhomma</i>	Rod	0,10655	2	n/a
<i>Tenuiphantes</i>	Rod	0,10388	8	n/a
<i>Ozyptila</i>	Rod	0,10357	2	n/a
<i>Scotinotylus</i>	Rod	0,10332	2	n/a
<i>Walckenaeria</i>	Rod	0,10183	2	n/a
<i>Parasteatoda</i>	Rod	0,09981	2	n/a
<i>Neottiura</i>	Rod	0,09859	3	n/a
<i>Philodromus</i>	Rod	0,09831	7	n/a
<i>Xysticus</i>	Rod	0,09648	12	n/a
<i>Evarcha</i>	Rod	0,09585	5	n/a
<i>Drassodes</i>	Rod	0,09546	2	n/a
<i>Robertus</i>	Rod	0,09380	4	n/a
<i>Meioneta</i>	Rod	0,09305	10	n/a
<i>Heliophanus</i>	Rod	0,09252	3	n/a
<i>Gonatium</i>	Rod	0,08988	3	n/a
<i>Piratula</i>	Rod	0,08921	2	n/a
<i>Episinus</i>	Rod	0,07998	3	n/a
<i>Enoplognatha</i>	Rod	0,07574	3	n/a
<i>Clubiona</i>	Rod	0,07076	6	n/a
<i>Phylloneta</i>	Rod	0,06546	2	n/a
<i>Caracladus</i>	Rod	0,06403	2	n/a
<i>Pardosa</i>	Rod	0,05754	12	n/a

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga C: Uporabljeni podatki za testiranje obstoja vrzeli med črtnimi kodami DNA

Takson	Kategorija	Povprečna K2P razdalja	Št. vrst	Št. osebkov
<i>Zelotes</i>	Rod	0,04857	2	n/a
<i>Alopecosa</i>	Rod	0,04721	5	n/a
<i>Erigone</i>	Rod	0,04522	3	n/a
<i>Micrommata virescens</i>	Vrsta	0,09592	n/a	2
<i>Araniella cucurbitina</i>	Vrsta	0,08846	n/a	2
<i>Heterotheridion nigrovariegatum</i>	Vrsta	0,05930	n/a	2
<i>Hypsosinga sanguinea</i>	Vrsta	0,05506	n/a	2
<i>Micrargus alpinus</i>	Vrsta	0,05090	n/a	2
<i>Pardosa blanda</i>	Vrsta	0,03843	n/a	2
<i>Mangora acalypha</i>	Vrsta	0,03403	n/a	3
<i>Dictyna arundinacea</i>	Vrsta	0,03233	n/a	2
<i>Amaurobius erberi</i>	Vrsta	0,02812	n/a	2
<i>Xysticus kochi</i>	Vrsta	0,02803	n/a	2
<i>Pocadicnemis juncea</i>	Vrsta	0,02671	n/a	2
<i>Malthonica silvestris</i>	Vrsta	0,02397	n/a	2
<i>Cyclosa conica</i>	Vrsta	0,02196	n/a	2
<i>Simitidion simile</i>	Vrsta	0,02196	n/a	2
<i>Steatoda bipunctata</i>	Vrsta	0,02196	n/a	2
<i>Agalenatea redii</i>	Vrsta	0,01989	n/a	2
<i>Drapetisca socialis</i>	Vrsta	0,01987	n/a	2
<i>Zilla diodia</i>	Vrsta	0,01591	n/a	2
<i>Maso sundevalli</i>	Vrsta	0,01588	n/a	2
<i>Scotinotylus alpigena</i>	Vrsta	0,01583	n/a	2
<i>Mansuphantes fragilis</i>	Vrsta	0,01387	n/a	2
<i>Alopecosa trabalis</i>	Vrsta	0,01387	n/a	2
<i>Thomisus onustus</i>	Vrsta	0,01387	n/a	2
<i>Heliophanus cupreus</i>	Vrsta	0,01385	n/a	2
<i>Crustulina guttata</i>	Vrsta	0,01186	n/a	2
<i>Zora spinimana</i>	Vrsta	0,01186	n/a	2
<i>Neottiura bimaculata</i>	Vrsta	0,01185	n/a	2
<i>Agyneta cauta</i>	Vrsta	0,00988	n/a	2
<i>Pelecopsis mengei</i>	Vrsta	0,00988	n/a	2
<i>Xysticus audax</i>	Vrsta	0,00988	n/a	2
<i>Clubiona reclusa</i>	Vrsta	0,00987	n/a	2
<i>Caracladus avicula</i>	Vrsta	0,00985	n/a	2
<i>Nuctenea umbratica</i>	Vrsta	0,00789	n/a	2
<i>Atypus piceus</i>	Vrsta	0,00789	n/a	2
<i>Zelotes latreillei</i>	Vrsta	0,00789	n/a	2
<i>Agroeca brunnea</i>	Vrsta	0,00789	n/a	2
<i>Evarcha laetabunda</i>	Vrsta	0,00789	n/a	2
<i>Misumena vatia</i>	Vrsta	0,00789	n/a	2
<i>Meioneta rurestris</i>	Vrsta	0,00789	n/a	2
<i>Araneus marmoreus</i>	Vrsta	0,00788	n/a	2
<i>Drassyllus villicus</i>	Vrsta	0,00788	n/a	2
<i>Pisaura mirabilis</i>	Vrsta	0,00788	n/a	2
<i>Alopecosa pulverulenta</i>	Vrsta	0,00591	n/a	2
<i>Pardosa oreophila</i>	Vrsta	0,00591	n/a	2

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga C: Uporabljeni podatki za testiranje obstoja vrzeli med črtnimi kodami DNA

Takson	Kategorija	Povprečna K2P razdalja	Št. vrst	Št. osebkov
<i>Evarcha arcuata</i>	Vrsta	0,00591	n/a	2
<i>Phylloneta impressa</i>	Vrsta	0,00591	n/a	2
<i>Parazygiella montana</i>	Vrsta	0,00590	n/a	2
<i>Tenuiphantes cristatus</i>	Vrsta	0,00590	n/a	2
<i>Episinus truncatus</i>	Vrsta	0,00590	n/a	2
<i>Theridion varians</i>	Vrsta	0,00590	n/a	2
<i>Tenuiphantes tenebricola</i>	Vrsta	0,00589	n/a	2
<i>Cercidia prominens</i>	Vrsta	0,00525	n/a	3
<i>Araneus sturmi</i>	Vrsta	0,00393	n/a	2
<i>Bolyphantes luteolus</i>	Vrsta	0,00393	n/a	2
<i>Linyphia triangularis</i>	Vrsta	0,00393	n/a	2
<i>Mughiphantes mughi</i>	Vrsta	0,00393	n/a	2
<i>Xerolycosa</i>	Vrsta	0,00393	n/a	2
<i>Theridion pinastri</i>	Vrsta	0,00393	n/a	2
<i>Xysticus lineatus</i>	Vrsta	0,00393	n/a	2
<i>Agyphantes expunctus</i>	Vrsta	0,00392	n/a	2
<i>Pardosa cf. lugubris</i>	Vrsta	0,00392	n/a	2
<i>Ebrechtella tricuspadata</i>	Vrsta	0,00392	n/a	2
<i>Inermocoelotes anoplus</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Araneus angulatus</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Araneus diadematus</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Argiope bruennichi</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Zelotes subterraneus</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Hahnia difficilis</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Megaleptyphantes nebulosus</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Minicia marginella</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Obscuriphantes obscurus</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Tapinocyba affinis</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Tenuiphantes flavipes</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Pardosa amentata</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Pardosa riparia</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Philodromus cespitum</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Pellenes seriatus</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Sitticus rupicola</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Tmarus piger</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Xysticus cristatus</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Xysticus tenebrosus</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Araneus quadratus</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Heliophanus flavipes</i>	Vrsta	0,00196	n/a	2
<i>Agelena labyrinthica</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Histoipona torpida</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Tegenaria atrica</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Aculepeira ceropegia</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Gibbaranea bituberculata</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Leviellus thorelli</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Clubiona terrestris</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Dictyna uncinata</i>	Vrsta	0	n/a	2

Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga C: Uporabljeni podatki za testiranje obstoja vrzeli med črtnimi kodami DNA

Takson	Kategorija	Povprečna K2P razdalja	Št. vrst	Št. osebkov
<i>Filistata insidiatrix</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Callilepis schuszteri</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Scotophaeus scutulatus</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Antistea elegans</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Centromerus pabulator</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Centromerus subalpinus</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Frontinellina frutetorum</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Gonatium rubellum</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Gonatium rubens</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Linyphia hortensis</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Meioneta affinis</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Meioneta orites</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Nematogmus sanguinolentus</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Neriere furtiva</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Pityohyphantes phrygianus</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Tenuiphantes alacris</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Tenuiphantes jacksoni</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Tenuiphantes mengei</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Tiso vagans</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Aulonia albimana</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Hogna radiata</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Pardosa palustris</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Pirata piraticus</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Trochosa sinipalpis</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Cheiracanthium punctarium</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Philodromus pulchellus</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Philodromus vagulus</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Tibellus macellus</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Sibianor aurocinctus</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Metellina mengei</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Metellina merianae</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Metellina segmentata</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Tetragnatha nigrita</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Crustulina scabripes</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Enoplognatha afrodite</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Enoplognatha ovata</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Phylloneta sisyphia</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Platnickina tincta</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Robertus truncorum</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Steatoda triangulosa</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Synema globosum</i>	Vrsta	0	n/a	2
<i>Hyptiotes paradoxus</i>	Vrsta	0	n/a	2

Priloga D: Uporabljeni podatki za analizo odnosa med črtnimi kodami DNA in značilnostjo morfoloških znakov

Takson	Značilnost morf. znakov	Povprečna K2P razdalja
<i>Megaleptyphantes</i>	Nizka	0,19570
<i>Leptyphantes</i>	Nizka	0,18388
<i>Pocadicnemis</i>	Nizka	0,17964
<i>Mughiphantes</i>	Nizka	0,16841
<i>Dysdera</i>	Nizka	0,14922
<i>Linyphia</i>	Nizka	0,14242
<i>Arctosa</i>	Nizka	0,13514
<i>Dictyna</i>	Nizka	0,12948
<i>Neriene</i>	Nizka	0,12613
<i>Micaria</i>	Nizka	0,12438
<i>Centromerus</i>	Nizka	0,12383
<i>Theridion</i>	Nizka	0,12234
<i>Agyneta</i>	Nizka	0,11031
<i>Tetragnatha</i>	Nizka	0,10796
<i>Cheiracanthium</i>	Nizka	0,10698
<i>Amaurobius</i>	Nizka	0,10685
<i>Porrhomma</i>	Nizka	0,10655
<i>Tenuiphantes</i>	Nizka	0,10388
<i>Scotinotylus</i>	Nizka	0,10332
<i>Philodromus</i>	Nizka	0,09831
<i>Drassodes</i>	Nizka	0,09546
<i>Robertus</i>	Nizka	0,09380
<i>Meioneta</i>	Nizka	0,09305
<i>Piratula</i>	Nizka	0,08921
<i>Phylloneta</i>	Nizka	0,06546
<i>Pardosa</i>	Nizka	0,05754
<i>Zelotes</i>	Nizka	0,04857
<i>Alopecosa</i>	Nizka	0,04721
<i>Araneus</i>	Visoka	0,15713
<i>Metellina</i>	Visoka	0,15612
<i>Marpissa</i>	Visoka	0,15164
<i>Steatoda</i>	Visoka	0,13553
<i>Hypsosinga</i>	Visoka	0,12999
<i>Tiso</i>	Visoka	0,12992
<i>Crustulina</i>	Visoka	0,12060
<i>Ozyptila</i>	Visoka	0,10357
<i>Walckenaeria</i>	Visoka	0,10183
<i>Parasteatoda</i>	Visoka	0,09981
<i>Neottiura</i>	Visoka	0,09859
<i>Xysticus</i>	Visoka	0,09648
<i>Evarcha</i>	Visoka	0,09585
<i>Heliophanus</i>	Visoka	0,09252
<i>Gonatium</i>	Visoka	0,08988
<i>Episinus</i>	Visoka	0,07998

Se nadaljuje

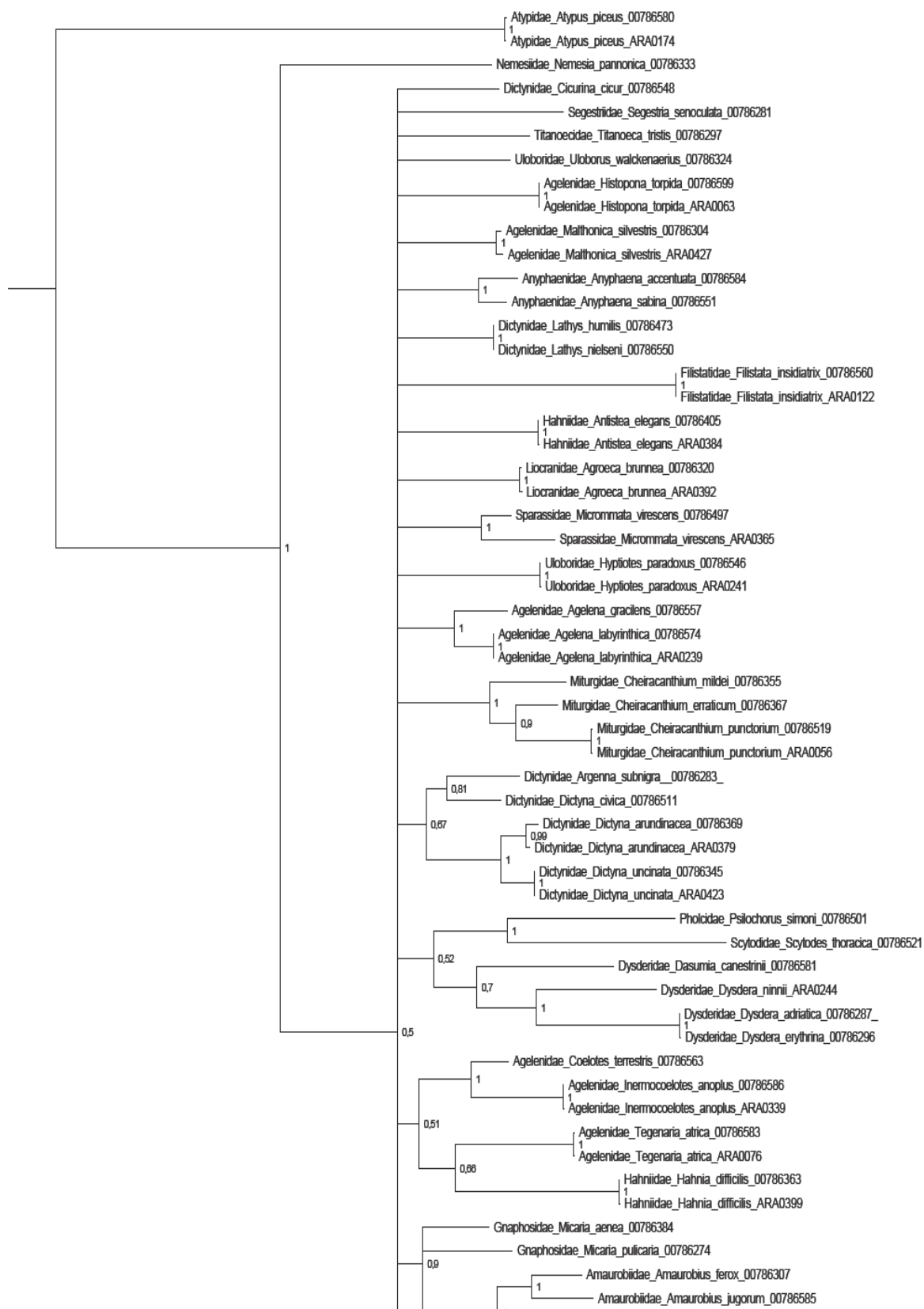
Nadaljevanje: Priloga D: Uporabljeni podatki za analizo odnosa med črtnimi kodami DNA in značilnostjo morfoloških znakov

Takson	Značilnost morf. znakov	Povprečna K2P razdalja
<i>Enoplognatha</i>	Visoka	0,07574
<i>Clubiona</i>	Visoka	0,07076
<i>Caracladus</i>	Visoka	0,06403
<i>Erigone</i>	Visoka	0,04522

Priloga E: Uporabljeni podatki za analizo vpliva velikosti geografskega območja vzorčenja na variabilnost črtnih kod DNA

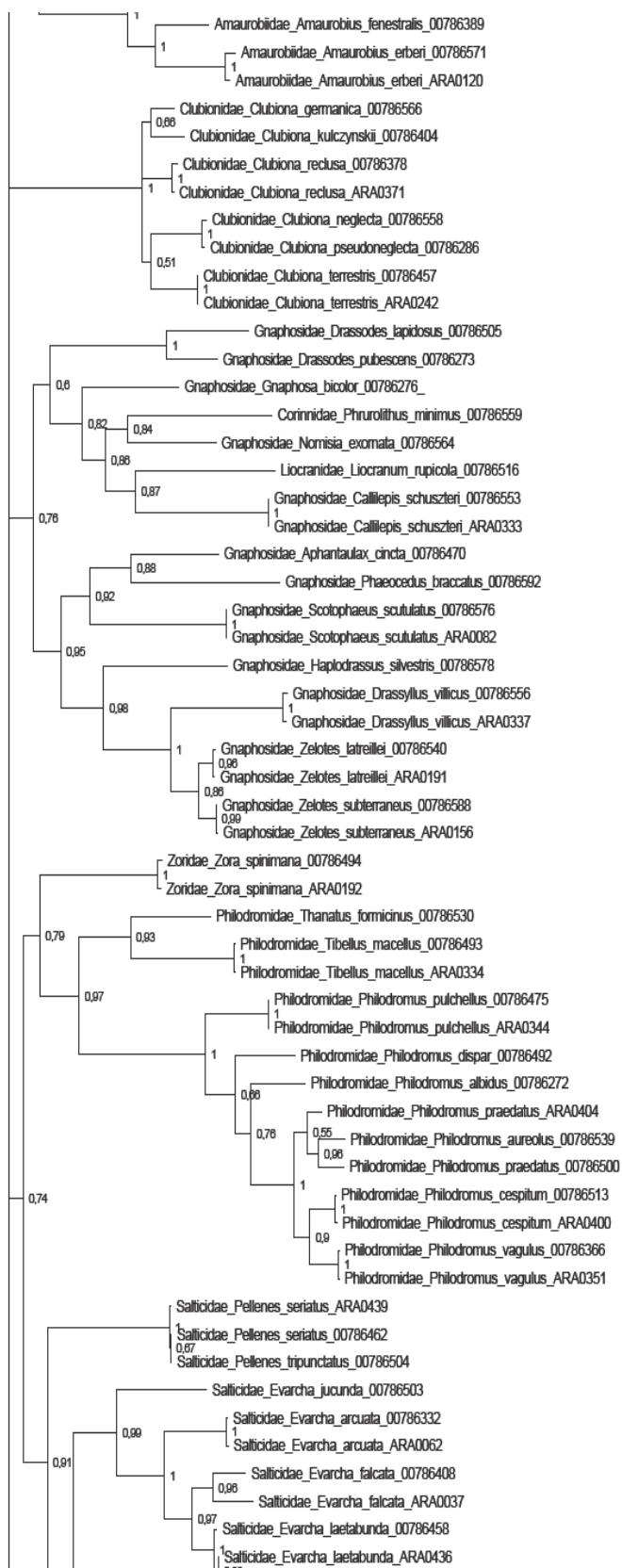
Vrste	Število kontinentov	Število osebkov	Povprečna p razdalja [%]
<i>Pardosa hortensis</i>	1	27	0,61
<i>Clubiona terrestris</i>	1	6	0,39
<i>Dictyna brevitarsa</i>	1	43	0,43
<i>Lycosa godeffroyi</i>	1	7	0,88
<i>Micrommata virescens</i>	1	15	1
<i>Neoscona arabesca</i>	1	199	1,14
<i>Salticus scenius</i>	1	17	0,41
<i>Tetragnatha laboriosa</i>	1	77	0,9
<i>Xysticus durus</i>	1	52	0,72
<i>Xysticus elegans</i>	1	63	1,28
<i>Alopecosa aculeata</i>	2	63	0,93
<i>Araneus diadematus</i>	2	57	0,25
<i>Clubiona trivialis</i>	2	60	1,04
<i>Cyclosa conica</i>	2	75	0,81
<i>Gnaphosa orites</i>	2	34	1,05
<i>Mermessus trilobatus</i>	2	27	0,27
<i>Misumena vatia</i>	2	136	0,86
<i>Ozyptila arctica</i>	2	33	0,59
<i>Philodromus dispar</i>	2	15	0,09
<i>Steatoda triangulosa</i>	2	22	0,38
<i>Alopecosa cuneata</i>	3	55	0,96
<i>Centromerus sylvaticus</i>	3	108	1,03
<i>Gnaphosa muscorum</i>	3	37	1,02
<i>Meioneta rurestris</i>	3	25	1,09
<i>Meioneta saxatilis</i>	3	28	2,11
<i>Pirata piraticus</i>	3	81	1,59
<i>Tegenaria domestica</i>	3	23	0,08
<i>Tetragnatha extensa</i>	3	178	1,25
<i>Theridion varians</i>	3	22	1,11
<i>Tiso aestivus</i>	3	14	0,83

Priloga F: Rekonstrukcija filogenetskega drevesa s programom MrBayes



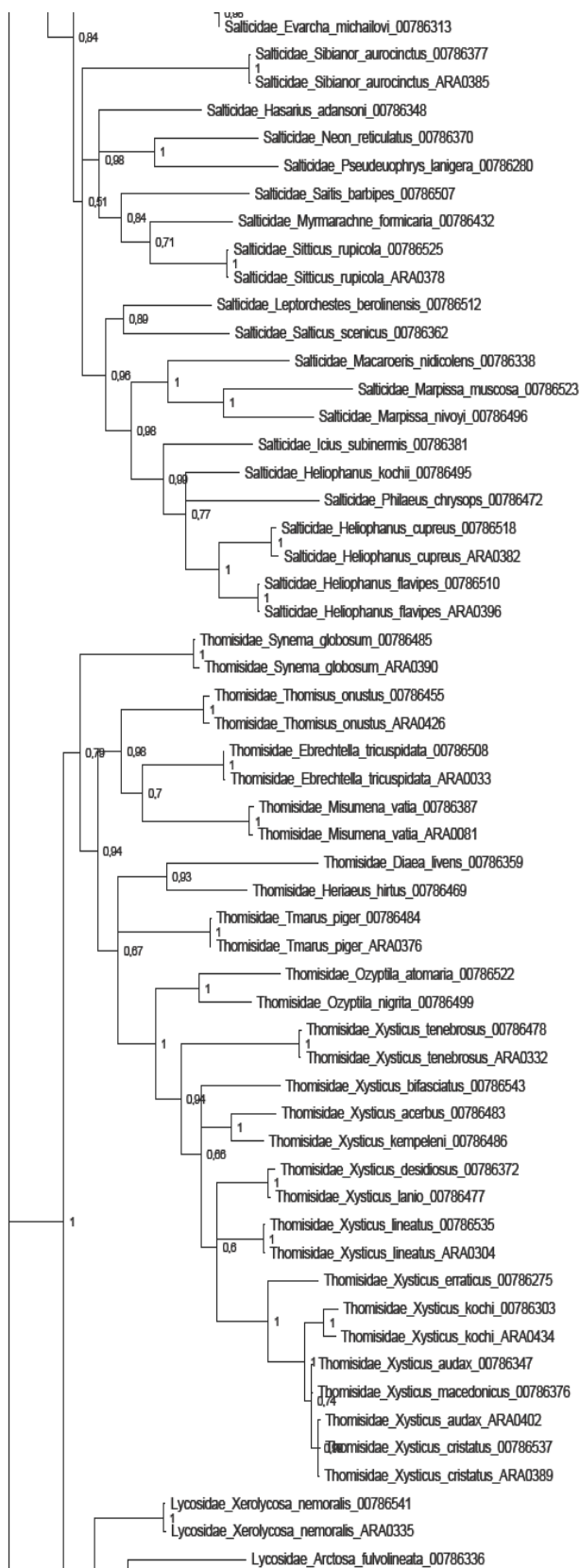
Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga F: Rekonstrukcija filogenetskega drevesa s programom MrBayes



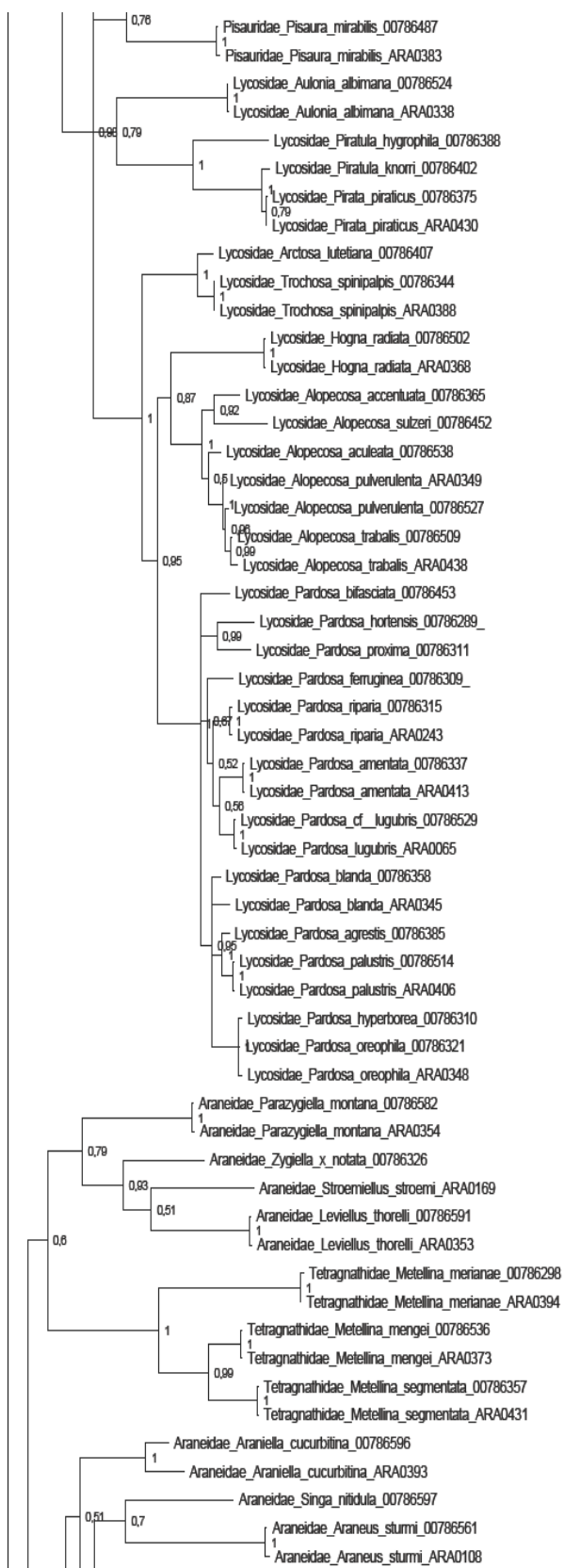
Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga F: Rekonstrukcija filogenetskega drevesa s programom MrBayes



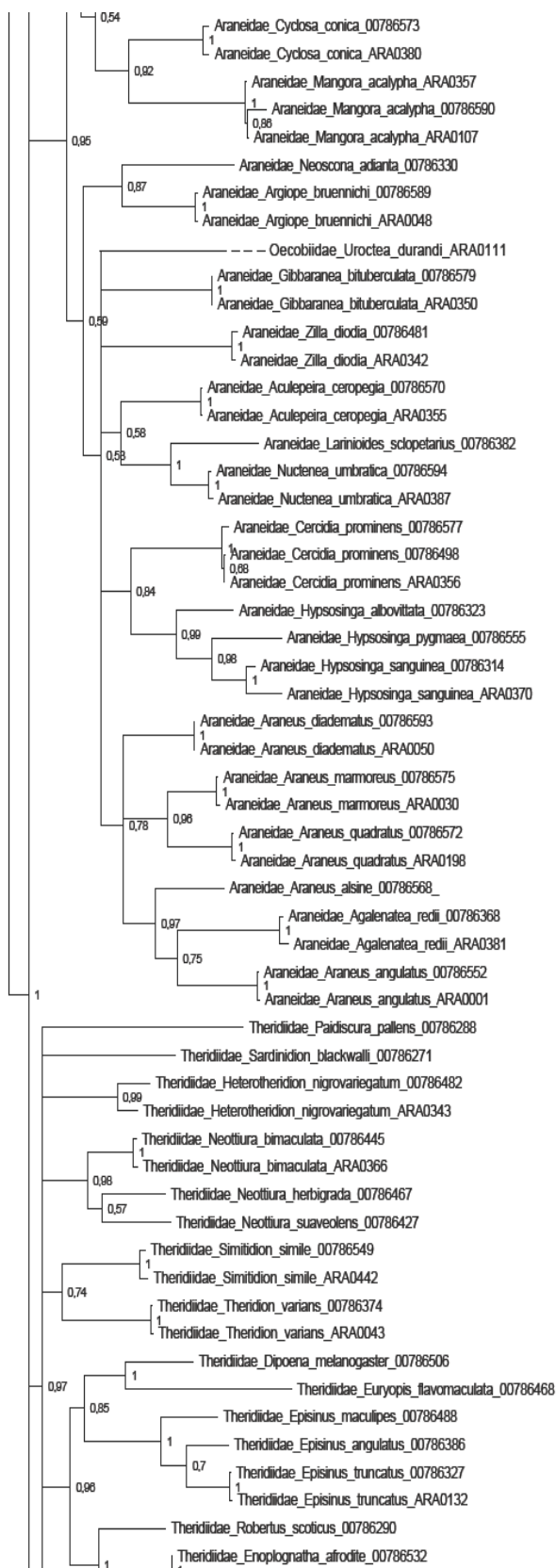
Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga F: Rekonstrukcija filogenetskega drevesa s programom MrBayes



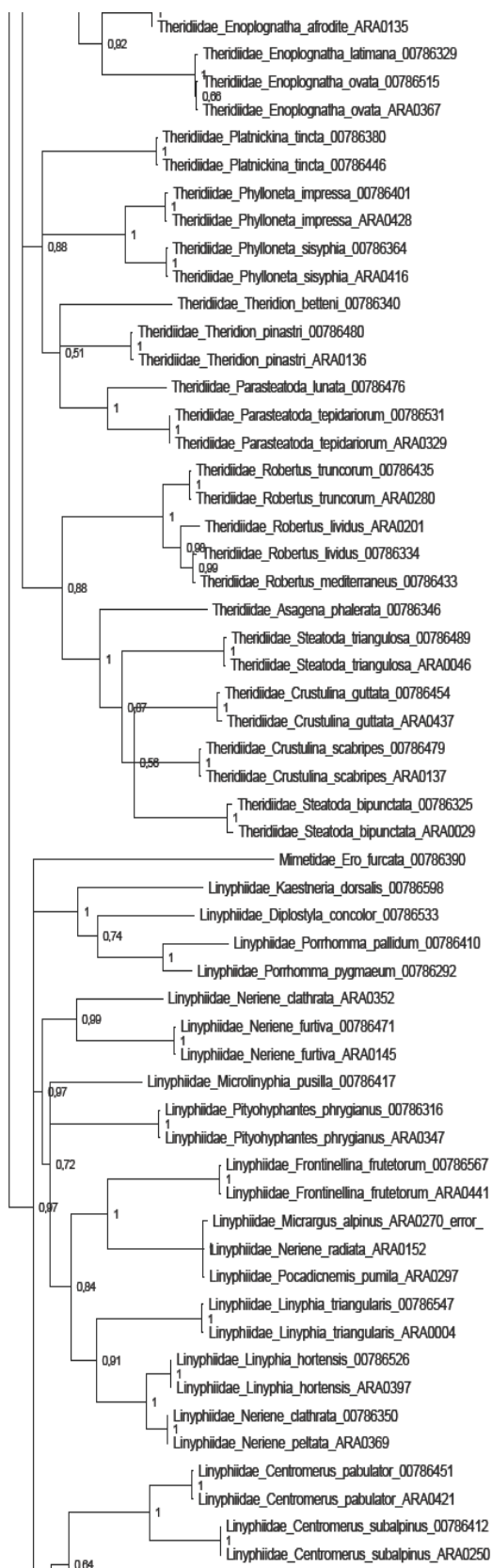
Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga F: Rekonstrukcija filogenetskega drevesa s programom MrBayes



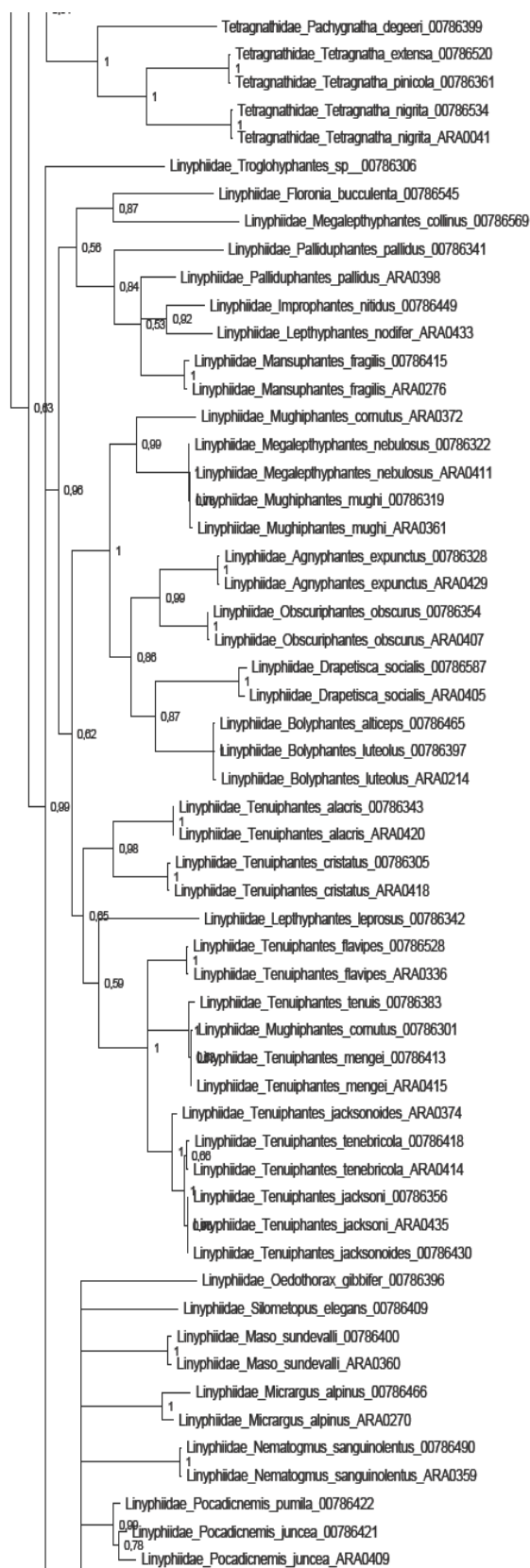
Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga F: Rekonstrukcija filogenetskega drevesa s programom MrBayes



Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga F: Rekonstrukcija filogenetskega drevesa s programom MrBayes



Se nadaljuje

Nadaljevanje: Priloga F: Rekonstrukcija filogenetskega drevesa s programom MrBayes

