

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ EKOLOGIJE IN BIODIVERZITETE

Nina LOZEJ

**RAZLIKE V IZBIRI PODLAGE IN ISKANJU  
ZATOČIŠČ MED POVRŠINSKIMI IN  
PODZEMELJSKIMI VODNIMI OSLIČKI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ EKOLOGIJE IN BIODIVERZITETE

Nina LOZEJ

**RAZLIKE V IZBIRI PODLAGE IN ISKANJU ZATOČIŠČ MED  
POVRŠINSKIMI IN PODZEMELJSKIMI VODNIMI OSLIČKI**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja

**DIFFERENCES BETWEEN SURFACE AND SUBTERRANEAN  
WATER LICE IN CHOOSING THE SUBSTRATE AND SEARCHING  
FOR SHELTER**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega magistrskega študijskega programa 2. bolonjske stopnje Ekologija in biodiverziteta, na Oddelku za biologijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za zoologijo Oddelka za Biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Senat Oddelka za biologijo je, na predlog Komisije za študij 1. in 2. stopnje, 20. 2. 2015 odobril temo magistrskega dela. Za mentorico magistrskega dela je imenoval doc. dr. Simono Prevorčnik in za recenzenta doc. dr. Primoža Zidarja. Za predsednika Komisije za oceno in zagovor magistrskega dela je bil imenovan izr. prof. dr. Rudi Verovnik.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: izr. prof. dr. Rudi VEROVNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Simona PREVORČNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Primož ZIDAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 13. 10. 2016

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

Nina Lozej

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 595.3(043.2)
KG	<i>Asellus aquaticus</i> /ekološka speciacija/vedenje/izbira habitata/tigmotaksija/podzemeljsko živalstvo
AV	LOZEJ, Nina, diplomirana biologinja (UN)
SA	PREVORČNIK, Simona (mentor)/ZIDAR, Primož (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij ekologije in biodiverzitete
LI	2016
IN	RAZLIKE V IZBIRI PODLAGE IN ISKANJU ZATOČIŠČ MED POVRŠINSKIMI IN PODZEMELJSKIMI VODNIMI OSLIČKI
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	IX, 48 str., 9 pregl., 18 sl., 3 pril., 96 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Uspešno naselitev živali v podzemlje so omogočile njihove morfološke, fiziološke in vedenjske prilagoditve. Za raziskave evolucije in prilagoditev na podzemlje so primerne zlasti vrste, ki so se tja vselile večkrat neodvisno in še imajo površinske prednike. Tak je enakonožni rak vodni osliček, <i>Asellus aquaticus</i> (L.), pri katerem podzemeljske in površinske populacije prihajajo v stik, genski pretok med njimi pa je zanemarljiv. Preverili smo, ali bi razlike v izbiri hrapave podlage in zatočišča lahko pojasnile reproduktivno bariero med površinskimi (Cerkniško in Planinsko polje) in podzemeljskimi (Rak in Pivka v Planinski jami) populacijami. V jamskem laboratoriju (tema, 10 °C) smo pri rdeči svetlobi (630 nm) 2 uri snemali vedenje posamičnih osličkov, 20 samcev in 20 samic iz vsake populacije. Iz posnetkov smo zabeležili čase prehodov iz gladke na hrapavo podlago oz. v zatočišče, ter čase daljšega mirovanja (> 5 min). Rezultate smo statistično obdelali s parametričnimi in neparametričnimi testi, primerjali smo vedenje po spolu, populaciji in ekomorfu. Pri opazovanju vedenja skupine po 20 samcev ali samic iz posamezne populacije smo skrivanje v zatočišču zabeležili po enem dnevu. Pri individualnih poskusih so vsi vodni oslički izbrali hrapavo podlago, a so se podzemeljski tam zadržali statistično značilno dlje. Ugotovitev je skladna s predvidoma močnejšo selekcijo za oprijem v podzemlju, od koder bi vodni tok živali odplaval na zanje neugodno površje. V nasprotju s predvidevanjem pa se površinski oslički niso skrili v zatočišče. Po petrijevki so se gibalali naključno ali pa so se, kot tudi nekateri podzemeljski, zatočišču celo izogibali. Nasprotno so se zlasti skupine površinskih osebkov po enem dnevu zbrale v zatočišču, kar kaže na velik pomen medsebojnega stika pri vodnih osličkih. Z opaženimi individualnimi razlikami ne moremo pojasniti reproduktivne izolacije med obema ekomorfoma. Potrebne bi bile nadaljnje raziskave individualnega in skupinskega vedenja vodnih osličkov.

### KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- ND Du2
- DC UDC 595.3(043.2)
- CX *Asellus aquaticus*/ecological speciation/behaviour/habitat choice/thigmotaxis/subterranean fauna
- AU LOZEJ, Nina, diplomirana biologinja (UN)
- AA PREVORČNIK, Simona (supervisor)/ZIDAR, Primož (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programmes in Ecology and Biodiversity
- PY 2016
- TI DIFFERENCES BETWEEN SURFACE AND SUBTERRANEAN WATER LICE IN CHOOSING THE SUBSTRATE AND SEARCHING FOR SHELTER
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
- NO IX, 48 p., 9 tab., 18 fig., 3 ann., 96 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB Successful colonization of subterranean habitats by cave animals depends on their morphological, physiological, but also behavioral adaptations. Multiple cave invasions and extant surface ancestors make some species great models for studying adaptations to this specific habitat. Such is the freshwater isopod *Asellus aquaticus* (L.), in which little or no gene flow exists between surface and cave populations, despite their contact. We examined the existence of a behavioral reproductive barrier between two surface populations (Cerkniško and Planinsko polje) and their cave counterparts (Rak and Pivka in the cave Planinska jama). We recorded the individual substrate choice and shelter seeking behavior of 20 male and 20 female specimens from each population in a speleolab (darkness, 10 °C) using dim red light (630 nm). The time spent either on a rough surface or in a shelter as well as time of rest (> 5 min) were recorded. Parametric and nonparametric statistical tests were performed. Behavior was compared by gender, population and ecomorph. Observations of group behavior (20 males or females) were also conducted. Individually, all water lice chose rough over smooth substrate, but the cave ecomorph stayed there significantly longer. We confirmed our prediction that the grip is under stronger selection in the cave specimens. It most likely prevents them from being washed away to the unfavorable surface habitats. Contrary to expectations, the surface water lice did not hide in the shelter; both ecomorphs wandered around randomly or even avoided the shelter. Group behavior experiments, however, showed that most of surface specimens aggregated in shelters after one day. The reproductive isolation between both ecomorphs could not be explained by the observed behavior of individuals. Further experiments are needed to analyze differences in individual as well as group behavior.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD) .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 EKOLOŠKA SPECIACIJA IN PODZEMLJE KOT NARAVNI LABORATORIJ .....	3
2.1.1 Ekološka speciacija .....	3
2.1.2 Podzemlje in podzemeljske živali .....	3
2.1.3 Jamske živali kot modelni organizmi .....	4
2.1.4 Vodni osliček kot modelni organizem .....	4
2.2 IZBIRA HABITATA .....	5
2.2.1 Opazovanje izbire habitata .....	6
2.2.2 Skrivanje v zatočišču .....	7
2.2.3 Opazovanje izbire habitata pri vodnem osličku .....	8
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>9</b>
3.1 VZORČENJE IN AKLIMACIJA VODNIH OSLIČKOV .....	9
3.2 VEDENJSKI POSKUSI .....	10
3.2.1 Testni petrijevki za individualne poskuse .....	10
3.2.2 Postavitev individualnih poskusov .....	12
3.2.3 Testna akvarija za skupinske poskuse .....	12
3.2.4 Potek individualnih poskusov .....	13
3.2.5 Potek skupinskih poskusov .....	14

3.3 ANALIZA PODATKOV .....	15
<b>3.3.1 Pregledovanje video posnetkov .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.2 Statistična analiza podatkov .....</b>	<b>16</b>
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>18</b>
4.1 IZBIRA HRAPAVE PODLAGE PRI INDIVIDUALNIH POSKUSIH.....	18
<b>4.1.1 Zadrževanje na hrapavi podlagi .....</b>	<b>18</b>
<b>4.1.2 Aktivnost vodnih osličkov .....</b>	<b>23</b>
4.2 IZBIRA ZATOČIŠČA PRI INDIVIDUALNIH POSKUSIH.....	23
<b>4.2.1 Zadrževanje v zatočišču .....</b>	<b>23</b>
4.3 SKUPINSKI POSKUSI Z VODNIMI OSLIČKI.....	26
<b>5 RAZPRAVA.....</b>	<b>30</b>
5.1 INDIVIDUALNA IZBIRA HRAPAVE PODLAGE PRI VODNEM OSLIČKU.....	30
5.2 INDIVIDUALNA IZBIRA ZATOČIŠČA PRI VODNEM OSLIČKU.....	32
5.3 SKUPINSKA IZBIRA ZATOČIŠČA PRI VODNEM OSLIČKU.....	33
5.4 TEŽAVE IN POMANJKLJIVOSTI IZVEDENIH RAZISKAV .....	35
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>37</b>
<b>7 POVZETEK.....</b>	<b>38</b>
<b>8 VIRI .....</b>	<b>41</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Osnovne statistike in rezultati Shapiro-Wilkovega testa normalnosti in Wilcoxonovega testa vsote rangov za vodne osličke, ločene po populaciji in spolu .....	18
Pregl. 2: Rezultati Fligner-Killeenovega testa homogenosti varianc in dodatnega Wilcoxonovega testa vsote rangov pri primerjavi populacij vodnega oslička, ločenih po spolu.....	19
Pregl. 3: Osnovne statistike in rezultati Shapiro-Wilkovega testa normalnosti in Wilcoxonovega testa vsote rangov za vodne osličke, ločene po populacijah .....	20
Pregl. 4: Rezultati Fligner-Killeenovega testa homogenosti varianc in dodatnega Wilcoxonovega testa vsote rangov pri primerjavi površinskih in podzemeljskih populacij vodnega oslička .....	20
Pregl. 5: Osnovne statistike in rezultati Shapiro-Wilkovega testa normalnosti in Wilcoxonovega testa vsote rangov za vodne osličke, ločene po ekomorfu .....	22
Pregl. 6: Rezultati Fligner-Killeenovega testa homogenosti varianc in dodatnega Wilcoxonovega testa vsote rangov pri primerjavi obeh ekomorfov vodnega oslička.....	22
Pregl. 7: Osnovne statistike in rezultati Shapiro-Wilkovega testa normalnosti in Studentovega t-testa za vodne osličke, ločene po populaciji in spolu.....	24
Pregl. 8: Rezultati dvosmerne analize variance za populaciji Planinsko polje in Pivka v Planinski jami, ločeni po spolu.....	25
Pregl. 9: Rezultati Studentovega t-testa z združeno standardno deviacijo za primerjavo vodnih osličkov s Planinskega polja in Pivke v Planinski jami, ločenih po spolu .....	25



## KAZALO SLIK

Sl. 1: Zemljevid z označenimi lokacijami vzorčenja vodnih osličkov ( <i>Asellus aquaticus</i> ) ..	9
Sl. 2: Petrijevka za preverjanje izbire hrapave podlage pri vodnih osličkih .....	11
Sl. 3: Petrijevka s hrapavim dnom in zatočiščem za preverjanje skrivanja v zatočišču pri vodnih osličkih. ....	11
Sl. 4: Postavitev poskusa za snemanje vedenja vodnih osličkov .....	12
Sl. 5: Akvarija za skupinske poskuse z vodnimi oslički .....	13
Sl. 6: Začetek individualnega vedenjskega poskusa z vodnimi oslički.....	14
Sl. 7: Začetek skupinskega poskusa z vodnimi oslički.....	15
Sl. 8: Čas zadrževanja po spolu ločenih populacij vodnih osličkov na hrapavi podlagi in Kruskal-Wallisova H statistika .....	19
Sl. 9: Čas zadrževanja površinskih in podzemeljskih populacij vodnega oslička na hrapavi podlagi in Kruskal-Wallisova H statistika .....	21
Sl. 10: Čas zadrževanja obeh ekomorfov vodnih osličkov na hrapavi podlagi.....	22
Sl. 11: Čas aktivnega premikanja vodnih osličkov po hrapavi podlagi za populacije, ločene po spolu .....	23
Sl. 12: Čas zadrževanja vodnega oslička v zatočišču za populacije, ločene po spolu.....	25
Sl. 13: Razporeditev vodnih osličkov s Planinskega polja v akvariju z gladkim dnom in dvema zatočiščema, po 24 urah skupinskega poskusa .....	26
Sl. 14: Razporeditev vodnih osličkov s Cerkniškega polja v akvariju z gladkim dnom in dvema zatočiščema, po 24 urah skupinskega poskusa .....	26
Sl. 15: Zbiranje samic vodnih osličkov s Planinskega polja in Cerkniškega polja v enem od zatočišč v akvariju z gladkim dnom in dvema zatočiščema, po 24 urah skupinskega poskusa.....	27
Sl. 16: Razporeditev vodnih osličkov s Cerkniškega polja v akvariju s hrapavo in gladko polovico z dvema zatočiščema, po 24 urah skupinskega poskusa.....	28
Sl. 17: Razporeditev vodnih osličkov iz Raka v Planinski jami v akvariju s hrapavo in gladko polovico z dvema zatočiščema, po 24 urah skupinskega poskusa.....	28
Sl. 18: Skupinski poskus z vodnimi oslički s Cerkniškega polja v akvariju s hrapavo in gladko polovico, pri katerem se je po 24 urah večino samic in samcev zbralo v obeh zatočiščih.....	29

## KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Načrt za izdelavo zatočišča za individualne poskuse izbire zatočišča

PRILOGA B: Svetlobni spekter LED diod v podlagi za petrijevke, ki smo jo uporabljali pri individualnih poskusih z vodnimi oslički

PRILOGA C: Primer časovnega poteka skupinskega poskusa z vodnimi oslički s Cerknškega polja

## 1 UVOD

Ekološka speciacija je proces, v katerem do reproduktivne izolacije med populacijami ali subpopulacijami pride zaradi divergentne naravne selekcije na račun razlik v okolju (Schluter, 2001). Iskanje mehanizmov te speciacije predstavlja enega največjih izzivov empiričnih raziskav v evolucijski biologiji (Schluter, 2001). Eden od možnih mehanizmov je habitatna izolacija, ki prepreči genski pretok med populacijami. Osnova zanjo je nezmožnost ene (pod)populacije, da živi v okolju druge, kar bistveno omeji njun medsebojni reproduktivni stik v času razmnoževanja in posledično zmanjša ali onemogoči možnost hibridizacije (Coyne in Orr, 2004). Do habitatne izolacije lahko privede različna izbira habitata, ki je definirana kot nabor hierarhično urejenih vedenj (Jones, 2001), pri čemer se osebek v enem tipu habitata nahaja dlje (tj. od pričakovanega ob naključnem gibanju) kot v drugem (Futuyma, 2001; Morris, 2003). Izbira habitata osebkoma omogoča prepoznavo zanj optimalnega okolja in preprečuje disperzijo v zanj suboptimalno, s čimer se poveča njegov fitness.

V podzemlju in na površju zaradi izrazitih razlik v okoljskih dejavnikih na živa bitja delujejo različni selekcijski pritiski okolja. Podzemlje zato predstavlja edinstveni naravni laboratorij za raziskave ekološke speciacije, pa tudi drugih evolucijskih in ekoloških vprašanj (Verovnik in sod., 2005; Protas in Jeffery, 2012; Klaus in sod., 2013; Konec in sod., 2015). Večina dosedanjih spoznanj temelji na raziskavah vodnih jamskih živali (t. i. stigobiontov), npr. jamskih rib, postranic, rakov enakonožcev in človeške ribice, številna vprašanja pa ostajajo še odprta (Trontelj, 2012). Čeprav so jamske živali tradicionalno proučevani primeri delovanja evolucije, so jih v raziskave naravne selekcije začeli intenzivno vključevati šele v zadnjih letih, najintenzivneje v okviru t. i. evolucijsko-razvojne biologije (ang. evolutionary developmental biology, kratica evo-devo) (White in Culver, 2012), vedno več pa tudi v okviru ekološke speciacije (Riesch in sod., 2016). Mehanizme njihovega nastanka raziskujejo s pomočjo modelnih vrst, ki poleg specifičnih prilagoditev na podzemlje premorejo tudi površinske prednike in so podzemlje osvojile večkrat z neodvisnimi vselitvami (Protas in Jeffery, 2012; Trontelj, 2012).

Med pomembnejše modelne vrste sodi tudi enakonožni rak vodni osliček, *Asellus aquaticus* (L.). Čeprav med podzemeljskimi in njihovimi predvidoma predniškimi površinskimi populacijami ni fizičnih pregrad in lahko prihajajo v medsebojni stik, z molekulskimi raziskavami med njimi niso dokazali genskega pretoka ali pa je bil ta zanemarljiv (Verovnik in sod., 2003; Konec, 2015). Eden od možnih mehanizmov za njihovo reproduktivno izolacijo je habitatna izolacija na račun razlik v izbiri habitata in s tem povezane razlike v vedenjskih vzorcih.

Med površinskim in podzemeljskim habitatom predvidoma obstajajo razlike v stopnji in tipu predacije. Na površini so tako oslički izpostavljeni večjemu številu različnih plenilcev

(ribam, ličinkam kačjih pastirjev, postranicam, ipd.), ki se pri lovu zanašajo predvsem na vid. Nasprotno so plenilci v podzemlju (npr. človeška ribica, slepe postranice) običajno manj vrstno pestri in številčni ter se pri lovu zanašajo na druga čutila. Na račun manj številčnih in slepih plenilcev je selekcija za skrivanje v podzemlju šibka v primerjavi z močno selekcijo na površju, kjer se morajo živali učinkovito skriti pred večjim številom plenilcev, ki za lov uporabljajo predvsem vid. S skrivanjem v zatočišču pa se lahko vodne živali sočasno izognejo tudi negativnemu vplivu vodnega toka. Čeprav ima odplavljanje osebkov ob povečanem pretoku negativne posledice v obeh primerih, je za podzemeljske osebkove izrazito neugodnejše; odplavljanje na površje zanje pomeni prisotnost močnejše kompeticije in predacije, ki verjetno onemogočata njihovo preživetje na površju (Sket, 2008). Na ta račun je selekcija proti odplavljanju pri podzemeljskih osebkih predvidoma močnejša kot pri površinskih. Naštete pričakovane medsebojne razlike v izbiri habitata lahko sprva privedejo do zmanjšanja in nato do prekinitve genskega pretoka med površinskimi in jamskimi živalmi oz. do reproduktivne izolacije.

V magistrski nalogi želimo s preverjanjem vedenjskih razlik med površinskimi in podzemeljskimi populacijami vodnega oslička ugotoviti, ali bi lahko bile osnova za obstoječo reproduktivno izolacijo. Pri tem smo se omejili na vedenjske razlike v izbiri ter zadrževanju v zatočišču in pa izbiri hrapave napram gladki podlagi. Pričakovali smo, da:

- se podzemeljski vodni oslički zaradi sproščene selekcije za skrivanje ne bodo skrivali v zatočišče, imeli pa bodo izrazito potrebo po oprijemu hrapave podlage zaradi močnega selekcijskega pritiska proti odplavljanju z vodnim tokom,
- se bodo površinski vodni oslički zaradi močne selekcije za skrivanje skrivali v zatočišče, potreba po oprijemu hrapave podlage pa bo pri njih manj izrazita zaradi šibkejšega selekcijskega pritiska proti odplavljanju z vodnim tokom.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 EKOLOŠKA SPECIACIJA IN PODZEMLJE KOT NARAVNI LABORATORIJ

#### 2.1.1 Ekološka speciacija

Ključna vloga naravne selekcije za nastanek novih vrst v zadnjem času ni več sporna, pomembno odprto vprašanje pa ostajajo mehanizmi, ki privedejo do speciacije (Schluter, 2009; Langerhans in Riesch, 2013). Ekološka speciacija je proces, v katerem do reproduktivne izolacije med populacijami ali subpopulacijami privede divergentna naravna selekcija, na račun razlik v okolju (Schluter, 2001). Divergentna selekcija je lahko posledica biotskih (npr. kompeticije, predacije) ali abiotskih (npr. podnebja, habitata, hrane) okoljskih razlik (Rundle in Nosil, 2005; Schluter, 2009). Nastanek reproduktivne izolacije med populacijami je dejansko stranski produkt njihove adaptacije na različne selekcijske pritiske (Mayr, 1942; Dobzhansky, 1951). Najbolj znani modelni organizmi za raziskave ekološke speciacije so npr. Darwinovi ščinkavci na Galapaških otokih (rodovi *Geospiza*, *Camarhynchus*, *Certhidea*, *Pinaroloxias*) in sladkovodna riba navadni zet (*Gasterosteus aculeatus*), pri katerih so prilagoditve na različne okoljske dejavnike povzročile reproduktivno izolacijo med subpopulacijami in posledično nastanek več različnih vrst (McKinnon in sod., 2004). Do izolacije lahko pride izjemno hitro, pri nevretenčarjih celo že v nekaj deset generacijah (Hendry in sod., 2007), težje pa je ugotoviti razlog(e) za prenehanje razmnoževanja med novonastalimi vrstami. Podzemlje z nanj prilagojenimi živalmi ponuja odlično možnost za študij ekološke speciacije.

#### 2.1.2 Podzemlje in podzemeljske živali

Podzemlje je s svojim specifičnim živalstvom dragocen modelni ekosistem za raziskave nastanka vrst (Strecker in sod., 2012), adaptivne radiacije (Trontelj in sod., 2012) in drugih evolucijsko-ekoloških vprašanj (npr. možnost sobivanja in sestava združb) (Fišer in sod., 2012). Razlog njegove primernosti za reševanje naštetih vprašanj so predvsem izrazite ekološke razlike med površjem in podzemljem, manjša kompleksnost podzemeljskih habitatov in s tem lažja prepoznavna selekcijskih pritiskov.

Podzemlje se od površja razlikuje predvsem po popolni temi, odsotnosti fotoavtotrofov (primarnih producentov), večinoma omejenem dotoku alohtonih organskih snovi in sorazmerno konstantnih abiotskih okoljskih dejavnikov (Baldwin in Beatty, 1941). Za razliko od teme, ki v podzemlju vrši močan selekcijski pritisk, je verjetno selekcijski pritisk drugih okoljskih dejavnikov (odsotnosti ali manjše prisotnosti predatorjev in kompetitorjev ter sorazmerne konstantnosti okoljskih razmer, vključno z visoko relativno vlago) tu sproščen (Trontelj, 2012). Ker so podzemeljski habitati manj kompleksni od površinskih, je prepoznavna selekcijskih pritiskov običajno lažja.

Vrste, ki jih najdemo izključno v podzemlju, delimo na kopenske in vodne troglobionte (imenovane tudi stigobioti) (Culver in Pipan, 2009). Členonožci so pogosti prebivalci podzemlja, nanj so se še posebej uspešno prilagodili raki, med njimi je namreč znanih že okoli 2900 troglobiotskih vrst (Gibert in Deharveng, 2002).

### 2.1.3 Jamske živali kot modelni organizmi

Kot modelni organizmi za evolucijsko-razvojne raziskave so jamske živali primerne predvsem zaradi svojih morfoloških prilagoditev na jamsko okolje (t. i. troglomorfoz): redukcije ali popolne izgube oči, depigmentacije in podaljšanja okončin (Verovnik in sod., 2003; Culver in Pipan, 2009), ki so se pri različnih jamskih živalih razvile konvergentno. Po Protas in Jeffery (2012) so dodatne lastnosti za njihovo primernost še: (i) večinoma so se razvile iz površinskih prednikov, kar omogoča predvidevanje o smeri evolucijske spremembe, (ii) ključni dejavnik za razvoj troglomorfoz, popolna in stalna tema, omogoča povezavo določene prilagoditve s specifičnim okoljskim dejavnikom in (iii) pri jamskih predstavnikih, ki še imajo na površju živeče predniške vrste, je možna medsebojna primerjava začetne in končne faze evolucije.

Tudi za študij ekološke speciacije so med modelnimi jamskimi živalmi v ospredju tiste, ki še imajo živeče površinske prednike. V podzemeljski biologiji ekološko speciacijo pogosto obravnavajo kot hipotezo adaptivnega premika (adaptive shift hypothesis) (Howarth, 1987). Znani so primeri iz tropov, kjer se površinske in podzemeljske vrste pojavljajo druga ob drugi, tj. parapatrično (Rivera in sod., 2002; Juan in sod., 2010), v zmernem pasu pa je tak primer vodni osliček, *Asellus aquaticus*. Najbolj proučevane podzemeljske vrste so: ribe iz rodov *Astyanax* (družina Characidae) (Protas in Jeffery, 2012) in *Poecilia* (družina Poeciliidae) (Kelley in sod., 2012), ribe iz družine Amblyopsidae ter raki (npr. predstavniki rodov *Gammarus*, *Niphargus* in *Asellus*). Največ evolucijsko-razvojnih raziskav je bilo doslej narejenih pri ribi *Astyanax mexicanus* (Rétaux in Casane, 2013), največ raziskav ekološke speciacije pa pri ribi *Poecillia mexicana* (Riesch in sod., 2016).

### 2.1.4 Vodni osliček kot modelni organizem

Vodni osliček, *Asellus aquaticus* (Linnaeus, 1758) je rak enakonožec (Crustacea: Isopoda), ki spada v družino vodnih osličkov (Asellidae). Je evritopa, evritermna in ekspanzivna vrsta (Henry in sod., 1996) ter eden najpogostejših in vsesplošno razširjenih sladkovodnih makro-nevretenčarjev (Turk-Prevorčnik in Blejec, 1998; Prevorčnik in sod., 2004; Verovnik in sod., 2009). Poseljuje različne tipe površinskih in podzemeljskih sladkovodnih habitatov (Sket, 1994; Henry in sod., 1996) po skoraj celotnem območju Evrope (Birštein, 1951; Williams, 1962), z izjemo nekaterih predelov Mediterana (Argano, 1979; Henry & Magniez, 1983).

Kljub razširjenosti in pogostosti je taksonomija vodnega oslička še precej pomanjkljiva (Prevorčnik in sod., 2004; Verovnik in sod., 2009). Opisane so številne podvrste (povzeto v Sket, 1994), največjo morfološko heterogenost in rasno diferenciacijo pa so ugotovili v Sloveniji (Prevorčnik in sod., 2004). Iz območja naših raziskav sta opisani dve podvrsti, površinski kranjski vodni osliček, *Asellus aquaticus carniolicus* Sket, 1965 in jamski vodni osliček, *A. a. cavernicolus* Racovitza, 1925. Prvi, predvidoma predniški, živi na izoliranih kraških poljih (Cerkniškem in Planinskem polju), drugi pa v podzemeljskih delih Postojnsko-planinskega jamskega sistema (PPJS). Že dalj časa je znano, da v podzemeljskem Raku in Pivki v Planinski jami pravzaprav živita morfološko (Prevorčnik in sod., 2004; Lasnik, 2012) in genetsko različni populaciji (Verovnik in sod., 2003, 2004; Konec, 2015), ki sta se v podzemlje vselili neodvisno (Verovnik in sod., 2004).

Vrsta je opredeljena kot negativno fototaktična in pozitivno tigmotaktična (Janzer in Ludwig, 1952; Novak, 2014). V ujetništvu se vodni oslički s Planinskega polja in Planinske jame uspešno križajo (Protas in sod., 2011), v naravnem okolju pa je genski pretok med njimi minimalen ali pa ga sploh ni (Verovnik in sod., 2003; Konec, 2015). Izolacija površinskih in podzemeljskih vodnih osličkov zaradi razlik v izbiri habitata bi v naravi verjetno zadostovala za ekološko reproduktivno bariero, kljub odsotnosti fizičnih barier in možnosti migracije med obema habitatoma (Trontelj, 2012).

Vodni osliček se vedno bolj uveljavlja kot modelni jamski nevretenčar v evolucijsko-razvojnih in raziskavah ekološke speciacije zaradi večkratnih neodvisnih vselitev v podzemlje na majhnem geografskem območju, obstoja površinskih predniških populacij, dobrega poznavanja filogenetske zgodovine vrste, kratkega življenjskega cikla ter uspešnega parjenja med površinskimi in podzemeljskimi osebki v laboratoriju (Baldwin in Beatty, 1941; Verovnik in sod., 2004; Protas in Jeffery, 2012). Poleg tega je tako površinske kot podzemeljske vodne osličke relativno enostavno uspešno gojiti v laboratoriju (Protas in Jeffery, 2012).

## 2.2 IZBIRA HABITATA

Pojem habitat (življenjsko okolje) je eden najpogosteje uporabljanih, a hkrati dvoumnih v ekologiji. Ne glede na kontekst pa velja, da populacije iste vrste pogosto živijo v različnih življenjskih okoljih, saj imajo pri izbiri le-teh različne preference. Habitat mora biti torej definiran glede na opazovane vrste in populacije ter na tak način, da odraža procese, ki delujejo v določenih prostorskih in časovnih okvirih (Morris, 2003). Ti procesi vključujejo populacijsko dinamiko ter znotraj- in medvrstne mehanizme, ki vplivajo na lokalno številčnost in porazdelitev posameznih osebkov. Morris (2003) je habitat definiral kot podmnožico prostorsko ločenih abiotskih in biotskih dejavnikov, ki s specifičnimi selekcijskimi pritiski vplivajo na populacijsko gostoto določene vrste. Habitatu so lahko prostorsko ločeni na različnih nivojih, tako lahko ta izraz predstavlja biom, ekosistem,

združbo, pa tudi zelo omejene prostore, kot je npr. specifičen del gostiteljske rastline ali živali (Denno in sod., 1995). Pojem habitat se torej nanaša na določen nabor biotskih in abiotskih okoljskih dejavnikov, ki jih vrsta uporablja za preživetje in razmnoževanje, pojem izbira habitata pa na hierarhično urejena vedenja, ki vodijo v časovno neporocionalno rabo različnih habitatov, s čimer se poveča fitnes osebkov (Hutto, 1985; Block in Brennan, 1993).

Izbira habitata osebkoma omogoča prepoznavo zanj optimalnega okolja in preprečuje disperzijo v zanj suboptimalno (Novak, 2014). Ključni okoljski dejavniki, ki opredeljujejo optimalen habitat določene vrste, so najbrž pomembno prispevali k evoluciji mehanizmov izbire habitata (Doligez in Boulinier, 2008). Primeri mehanizmov, ki privedejo do izbire habitata, vključujejo aktivno premikanje proti izbranemu habitatu, zmanjšano disperzijo, ko osebek doseže izbrani habitat, pa tudi spremembo v času disperzije, ki vpliva na verjetnost prehoda v drug tip habitata (Webster in sod., 2012). Vselitev v nov habitat lahko oslabi ali pa poveča selekcijski pritisk na eno ali kombinacijo večih lastnosti, pri čemer pride ali do njihove izgube ali do pridobitve novih lastnosti. Ob hitrih spremembah življenjskega okolja so nekatere vrste sposobne spremeniti svoje vedenjske odzive pri izbiri habitata. Jones in Boulding (1999) sta na primer tovrstno fleksibilnost pri izbiri mikrohabitata ugotovila pri morskih polžih iz rodu breženk, *Littorina sitkana* Philippi, 1846.

Izbira habitata, ki jo opredeljuje preferenca osebkov do življenja v določenem habitatu, je poleg sposobnosti adaptacije populacije na lokalne okoljske razmere ključni moment ekološke speciacije (Rausher, 1984; Ravigné in sod., 2009). Privede lahko namreč do habitatne izolacije, ki predstavlja ekološko bariero za genski pretok med populacijami (Webster in sod., 2012). O habitatni izolaciji govorimo, če prostorska ločitev med dvema taksonoma temelji na njunih medsebojnih bioloških (torej genetskih) razlikah (Coyne in Orr, 2004). Osnova zanjo je nezmožnost enega taksona, da živi v okolju drugega, zaradi: (i) genetskih razlik v fitnesu osebkov, povezanih z rabo določenega okolja, (ii) kompeticije, ki sili simpatrične taksona v rabo različnih niš ali (iii) sposobnosti osebkov, da iščejo habitat na katerega so najbolj prilagojeni. Bistvo habitatne izolacije je omejitev ali pa preprečitev reproduktivnega stika med osebki različnih (pod)populacij v času razmnoževanja in s tem bistveno zmanjšanje ali onemogočenje njihovega navzkrižnega parjenja (hibridizacije). Izbira habitata vpliva na nastanek reproduktivne izolacije preko divergentne selekcije, ki v (pod)populacijah vzdržuje stabilne polimorfizme, ter s pojavom izbirnega parjenja, pri katerem imajo hibridni osebki nižji fitnes (Webster in sod., 2012).

### **2.2.1 Opazovanje izbire habitata**

Opazovanje je raziskovalna metoda, s pomočjo katere zbiramo različne podatke o opazovanem osebku. Lahko jo uporabljamo v naravnem ali laboratorijskem (kontroliranem) okolju. Pri opazovanju vedenja iščemo vedenjske vzorce, ki predstavljajo osebkov odnos do



različnih pojavov. Opišemo jih lahko kvalitativno ali kvantitativno, temu primerna je tudi analiza zbranih podatkov.

Z razvojem optične tehnologije in računalniških programov je postala ekologija gibanja živali (ang. movement ecology) priljubljena tema raziskav. Vedno zmogljivejše in natančnejše naprave za zaznavo lokacije namreč pripomorejo k boljšemu razumevanju vplivov na gibanje in distribucijo živali (Nathan in sod., 2008; Schick in sod., 2008). Čeprav so za takšne raziskave primerne predvsem večje živali (npr. ptice, kiti, glodalci, velike zveri), se je povečalo tudi število raziskav manjših živali, predvsem kopenskih nevretenčarjev: čebel, mravelj in rakov prašičkov (Božič in Abramson, 2003; Zidar in sod., 2005; Robinson in sod., 2008; Devigne in sod., 2011). Za njihovo opazovanje znanstveniki večinoma uporabljajo fotoaparati ali video kamero, ki sta nameščena nad "poskusno areno", iz video posnetkov pa s pomočjo računalniških programov analizirajo gibanje živali (Martin, 2004). Posamezne osebkke pogosto dodatno označijo za lažje sledenje (Freilich, 1989).

Pri opazovanju vedenja vodnih živali v laboratoriju se pojavijo nekatere tehnične ovire, ki jih pri opazovanju kopenskih živali ni, npr. zahtevnejše označevanje osebkov ter lom in odboj svetlobe na vodni gladini ob posledično zahtevnejši postavitvi vira svetlobe ter kamere (Augusiak in sod., 2015). Verjetno so ravno metodološke težave razlog, da je tovrstnih vedenjskih raziskav malo (npr. Englund and Hambäck, 2004). Lagerspetz in Vainio (2006) sta opozorila tudi na pomen zagotavljanja primerne podlage, ki bentoškim živalim med opazovanjem vedenja zagotovi oprijem in normalno hojo. Do enakega zaključka so prišli tudi Friedrich in sod. (2011) pri vedenjskih poskusih s kopenskim troglobiotskim hroščem *Ptomaphagus hirtus* iz družine mrharčkov (Leiodidae). Holoyak in sod. (2008) pa so opozorili na dejstvo, da večina raziskav gibanja nevretenčarjev poteka s skupinami osebkov (na nivoju populacij) in da ne upoštevajo variabilnosti vedenja posamičnih osebkov, kar poslabša razumevanje dejavnikov, ki vplivajo na vedenje.

### 2.2.2 Skrivanje v zatočišču

Na živali delujejo številni neugodni abiotski (npr. poplave, onesnaženje, pomanjkanje hrane) in biotski (predatorji, kompetitorji) dejavniki, katerih vplivom se poskušajo izogniti. Ena od možnosti je umik v zatočišče. Ekološka teorija predvideva, da bo obstoj populacije v določenem habitatu verjetnejši, če si tam osebkki lahko enostavno poiščejo zatočišče (Fingerut in sod., 2015). Vedenjske vzorce iskanja zatočišča pogosto obravnavajo v povezavi z ali pa povsem kot tigmotaksijo, ki je definirana kot usmerjen gibalni ali orientacijski odziv organizma na fizični kontakt oziroma dotik (Simon in sod., 1994). Organizem je pozitivno tigmotaktičen, če aktivno išče stik z drugimi objekti. V zatočišču je žival navadno z velikim delom telesa v fizičnem stiku z deli zatočišča. V prvotnih raziskavah tigmotaksije so opazovali predvsem miši in druge glodalce, pri katerih je znan pojav gibanja ob robu oziroma ob stenah zaprtega prostora (ang. wall-following behavior) (Simon in sod.,

1994). Zatočišča nekaterih kopenskih nevretenčarjev, npr. rakov enakonožcev iz rodov *Oniscus*, *Porcellio* in *Armadillidium* poleg fizičnega stika običajno zagotavljajo tudi nižjo osvetlitev ter višjo vsebnost vlage, zaradi česar so vzorci tigmotaktičnega, fototaktičnega in higrokinetičnega vedenja živali tesno povezani (Friedlander, 1964). Pri vodnih nevretenčarjih vlažnost okolja ni razlog za iskanje skrivališča, najpomembnejša dejavnika sta običajno predacija in povečanje hitrosti vodnega toka (Fingerut in sod., 2015). Skrivanje v zatočišču sicer pomeni manjšo verjetnost uplenjenja in odplavljenja, a tudi manj priložnosti za hranjenje in razmnoževanje (Harris in sod., 2011).

### 2.2.3 Opazovanje izbire habitata pri vodnem osličku

Fotofobijo in izbiro zatočišča (ki sta jo poimenovala tigmotaksija) sta pri površinskih vodnih osličkih iz Nemčije opazovala Janzer in Ludwig (1952). V poskuse sta vključila večje skupine najmanj pigmentiranih in najbolj fotofobnih osličkov, ker sta preverjala t. i. teorijo "pasti" za vselitev v podzemlje (Ludwig, 1942). Po njej naj bi temno podzemlje za te osebkke delovalo kot past, ki naj bi jo zapustili redkeje od močno pigmentiranih in manj fotofobnih osebkov. Ugotovila sta, da so vodni oslički sicer fotofobni, a vendar njihova tigmotaksija prevladuje nad fotofobijo. Tudi ob osvetlitvi so namreč osebkki ostali zbrani pod prozornim stekelcem (v zatočišču) in se niso umaknili v neosvetljeni del akvarija (podzemlje).

Odziv nizozemskih vodnih osličkov na vodni tok so proučevali Peeters in sod. (2002). Opazovali so medsebojne vplive strukture substrata in hitrosti vodnega toka na rast ter preživetje vodnih osličkov. Spremembe vedenja kot posledico kolonizacije novega habitata ter povezavo s prisotnostjo plenilcev so pri površinskih vodnih osličkih na Švedskem proučevali Harris in sod. (2011). Obravnavali so jih posamično. Osebkki iz populacije, pri kateri so glavni plenilci ribe (pomemben vid), so po simuliranem napadu aktivno bežali daljši čas kot osebkki iz populacije, pri kateri so plenilci predvsem nevretenčarske ličinke (pomembna dotik in vonj). S to ugotovitvijo so potrdili, da je razlika v habitatih s selekcijo privedla do različnih proti-plenilskih strategij in da na fenotipske spremembe ob kolonizaciji novega habitata vplivajo predvsem razlike v prisotnih plenilskih vrstah, heterogenost habitata, populacijska gostota in spolno vedenje. V podzemeljskih habitatih plenilcev, ki bi se pri lovu zanašali na vid praktično ni, zato iskanje zatočišča in skrivanje pred plenilci nima več ključne vloge pri preživetju posameznega osebkka.

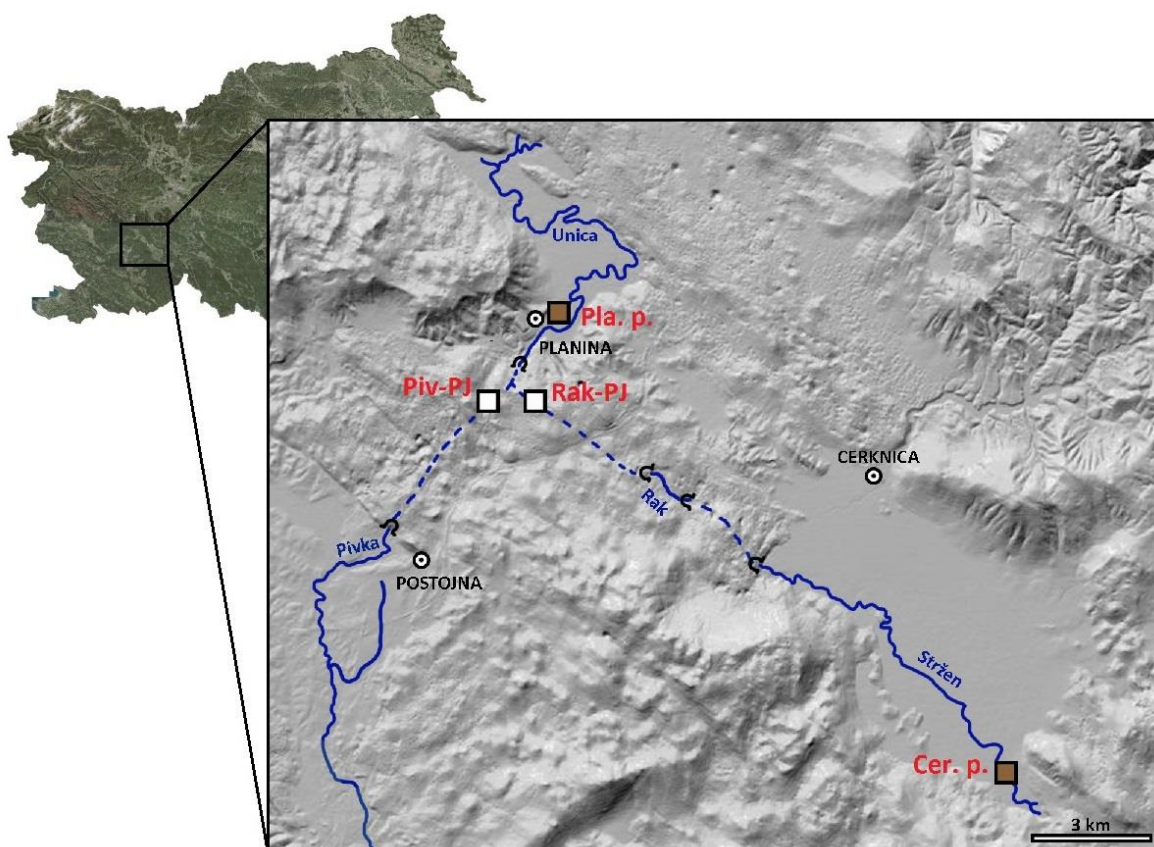
Eroukhmanoff in sod. (2011) so v raziskavi zgoraj omenjenih populacij vodnih osličkov ugotovili, da je indirektna posledica prilagoditev na različne plenilske režime izbirno parjenje (ang. assortative mating) osebkov. Sklepali so, da je predparitvena izolacija med osebkki različnih ekotipov posledica lokalne adaptacije in ne geografske izolacije, selitvena modifikacija (ang. migration modification) pa ima pri tem večjo vlogo kot izbira partnerja. Rezultati njihovih poskusov in simulacij nakazujejo, da je reproduktivna bariera zaradi izbire partnerja in habitata pomembna predvsem v zgodnji fazi divergence.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 VZORČENJE IN AKLIMACIJA VODNIH OSLIČKOV

Analizirali smo vedenje vodnih osličkov iz dveh površinskih populacij – Planinskega polja in Cerkniškega polja – ter dveh podzemeljskih populacij – podzemeljskega dela ponikalnic Pivke in Raka v Planinski jami (Slika 1).

Na Planinskem polju (Pla. p. na Sliki 1) smo osličke nabrali 20. 11. 2015, v jarku pod cesto Unec–Planina, pr. 600 m od mostu čez Unico proti Planini. Muljnato dno jarka je bilo gosto poraslo z vodnim rastlinjem. Isti dan smo nabrali tudi osličke v Planinski jami, v obeh ponikalnicah (Piv-PJ in Rak-PJ na Sliki 1), pr. 200 m gorvodno od njunega podzemeljskega sotočja v jami. Dno je bilo prodnato-skalno. Na Cerkniškem polju (Cer. p. na Sliki 1) smo osličke nabrali 12. 12. 2015, v površinski strugi ponikalnice Stržen, pod mostom med vasema Gorenje jezero in Laze pri Gorenjem jezeru. Dno je bilo muljnato in gosto poraslo s trstičjem.



Slika 1: Zemljevid z označenimi lokacijami vzorčenja vodnih osličkov, *Asellus aquaticus*. Pla. p. = Planinsko polje, Piv-PJ = Pivka v Planinski jami, Rak-PJ = Rak v Planinski jami, Cer. p. = Cerkniško polje; rjavi kvadrat = površinski ekomorf, beli kvadrat = podzemeljski ekomorf.

Na površju smo vzorčili z vodno mrežico. Po odstranitvi večjih kosov rastlinja in mulja iz vzorca smo vzorec iz mrežice predstavili v banjico z vodo. Večje (5–15 mm dolge) in na videz nepoškodovane vodne osličke smo z žličko preložili v plastično posodo z vodo in nekaj listi za oprijem med transportom. V jami smo vodne osličke posesali s sesalko direktno iz skal ali jih ujeli v mrežico po tem, ko smo jih nežno odstranili s skal z roko. Poleg tega smo manjše kamne vzeli iz vode, jih držali tik nad banjico z vodo ter počakali, da so oslički sami popadali vanjo ali pa smo jih nežno predstavili z mehko pinceto. Tudi tu smo v posodo dodali nekaj vejic ali listov, ki smo jih našli v bližini vzorčnega mesta. Vodne osličke smo prepeljali v jamski laboratorij (tema,  $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) Katedre za zoologijo, Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete, kjer je potekala aklimacija in vsi vedenjski poskusi. V posode smo kot vir hrane dodali po nekaj razkrajajočih listov črne jelše (*Alnus glutinosa*).

Vsem nabranim osebkom smo pod stereomikroskopom po obliki gonopodov določili spol in preverili, če v njih ni bilo parazitov ježerilcev (*Acanthocephala*), ki bi lahko vplivali na njihovo vedenje (Moore, 2002). Pred začetkom izvajanja poskusov smo iz vsake populacije izbrali po 40 nepoškodovanih odraslih osebkov, 20 samic in 20 samcev. Vsak osebek smo dali v svojo petrijevko ( $2r = 90\text{ mm}$ ,  $v = 25\text{ mm}$ ) z vodo ( $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in razkrajajočim listom črne jelše ter mu dodelili unikatno identifikacijsko oznako. Aklimacija v ločenih petrijevkah je trajala vsaj en teden, vedenjske poskuse pa smo izvedli med 17. 12. 2015 in 15. 2. 2016. Med poskusi poginule in poškodovane samce in samice smo nadomestili s samci in samicami iz istih populacij, ki jih dotlej v poskusih še nismo uporabili. Izjema so bile samice iz Pivke v Planinski jami, ki jih je po individualnih poskusih izbire zatočišča poginilo več kot smo jih lahko nadomestili. Zato smo pri individualnih poskusih izbire hrapave podlage pri tej populaciji uporabili več samcev (24) kot samic (12).

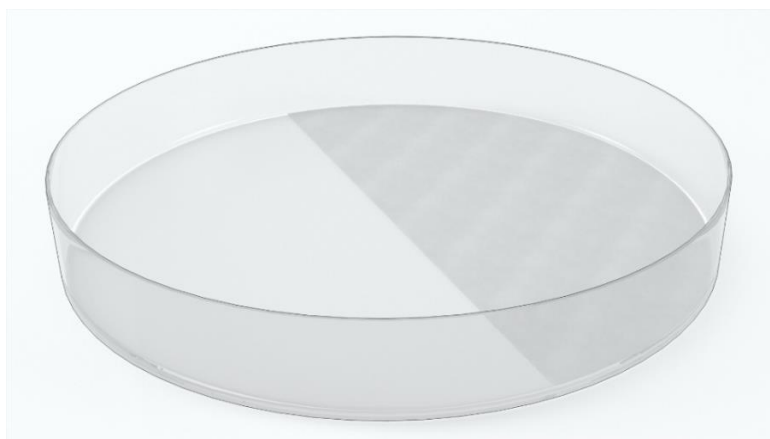
## 3.2 VEDENJSKI POSKUSI

Izvedli smo dva tipa individualnih (tj. s posamičnimi osebkami) vedenjskih poskusov, izbiro hrapave podlage in skrivanja v zatočišču. Dodatno smo izvedli preliminarne skupinske (tj. s skupinami večih osebkov) vedenjske poskuse izbire hrapave podlage in skrivanja v zatočišču.

### 3.2.1 Testni petrijevki za individualne poskuse

Osebke smo opazovali v dveh tipih za naše poskuse prirejenih petrijevki:

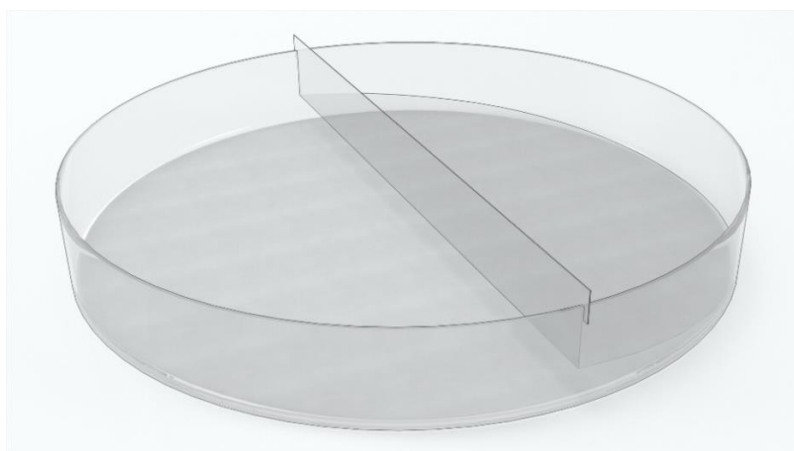
A) Petrijevka za preverjanje izbire hrapave napram gladki podlagi (Slika 2) je imela premer 90 mm in višino 25 mm. Polovico dna smo zbrusili s finim brusilnim papirjem granulacije P150. Tako so imeli oslički na njej dober oprijem, še vedno pa je bila dovolj prepustna za svetlobo za uspešno video rekonstrukcijo gibanja (glej spodaj). Druga polovica dna je ostala gladka in osličkom ni nudila oprijema.



Slika 2: Petrijevka za preverjanje izbire hrapave (temno sive) napram gladki (svetlo sivi) podlagi pri vodnih osličkih.

B) Petrijevka za preverjanje skrivanja v zatočišču (Slika 3) je imela enake dimenzije, vendar tokrat smo s finim brusilnim papirjem iste granulacije zbrusili celotno dno. To smo storili zato, ker so oslički sicer na gladkem dnu mrzlično iskali oprijem (npr. se oprijeli stičišča zatočišč in petrijevke) in se na zatočišče niso odzvali. S hrapavim dnom smo zagotovili neovirano gibanje po celotni petrijevki in opazovanje odziva na zatočišče.

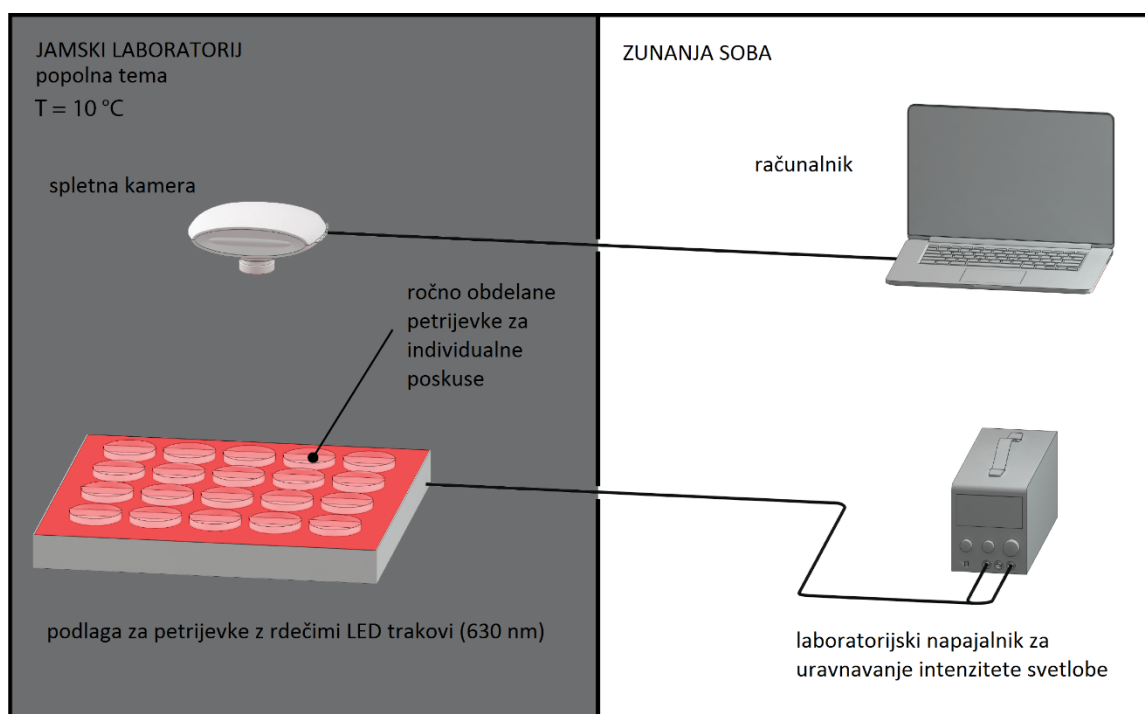
Zatočišče smo izdelali iz prozorne plastične plošče VIVAK (debeline 0,75 mm) in ga namestili v polovico petrijevke. Zatočišče je bilo od dna najbolj odmaknjeno na sredini petrijevke (približno 1 cm), proti obodu pa se je enakomerno spuščalo do dna. Zaradi rahlega naklona so lahko različno velike živali s celim telesom prišle v stik z zatočiščem ("zagozdenje"). Na središčnem robu je bila plastika zapognjena navzgor, kar je osličkom preprečevalo prehod na zgornjo ploskev zatočiščja, zlezli so lahko le podenj. Ker je bilo zatočišče prozorno, so bili oslički dobro vidni tudi na video posnetkih (glej spodaj). Načrt za izdelavo zatočiščja je prikazan na Sliki A1 v Prilogi A.



Slika 3: Petrijevka s hrapavim dnom in zatočiščem za preverjanje skrivanja v zatočišču pri vodnih osličkih.

### 3.2.2 Postavitev individualnih poskusov

Postavitev poskusa za snemanje vedenja posamičnih vodnih osličkov prikazuje Slika 4. Podlago za petrijevke (50 x 50 cm) so sestavljali enakomerno razmaknjeni in zaporedno vezani trakovi z rdečimi LED diodami (pr. 630 nm, svetlobni spekter je prikazan na Sliki B1 v Prilogi B), nad katerimi je bila plošča iz opalnega pleksi stekla (debeline 5 mm), ki je svetlobo enakomerno razpršila. LED trakove je napajal laboratorijski napajalnik BaseTech BT-305, ki smo ga postavili izven jamskega laboratorija. Nastavili smo ga tako, da je bila svetloba šibka (intenziteta = 0,15-0,25  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Pol metra nad podlago za petrijevke je bila nameščena spletna kamera Logitech C930e FullHD, povezana z računalnikom, ki smo ga postavili izven jamskega laboratorija.

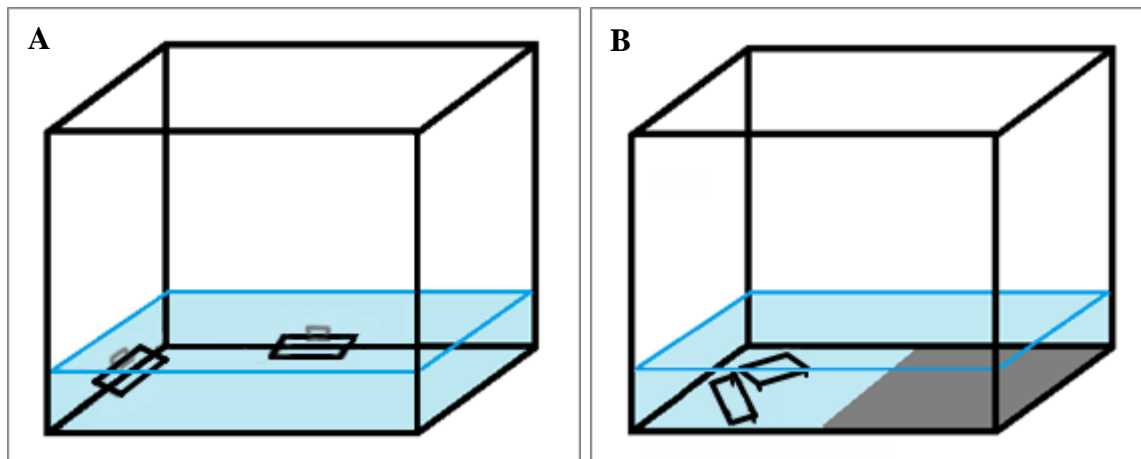


Slika 4: Postavitev poskusa za snemanje vedenja vodnih osličkov.

### 3.2.3 Testna akvarija za skupinske poskuse

Pri preliminarnih skupinskih poskusih smo sledili načinu postavitve v raziskavi, ki sta jo izvedla Janzer in Ludwig (1952). Poskusi so potekali v kvadratnih steklenih akvarijih dimenzije 20 x 20 cm, z višino vode 2 cm in z dvema zatočiščema iz iz objektnih stekel dimenzij 5 x 11 cm (Slika 5). Uporabili smo osebke iz individualnih poskusov. Pri prvem tipu poskusa je bilo celotno dno akvarija gladko, zatočišči pa smo postavili ob steni akvarija in ju z vodoodpornim lepilnim trakom pričvrstili nanju (slika 5A). Pri drugem tipu poskusa smo polovico gladkega dna prelepili s hrapavo folijo. Tokrat smo uporabili samostoječi

zatočišči; na daljšo stranico objektivnih stekelc smo s silikonom prilepili stekleni "nožici" višine 4 – 5 mm. Zatočišči smo postavili na gladko polovico nekoliko stran od roba akvarija.

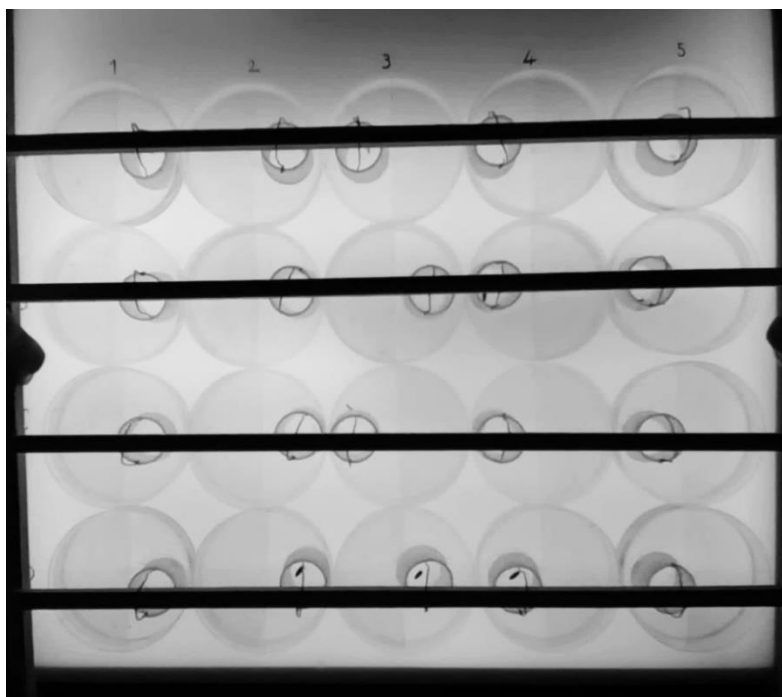


Slika 5: Akvarija za skupinske poskuse z vodnimi oslički. A) Akvarij z gladkim dnom in dvema zatočiščema ob steni. B) Akvarij s polovico dna hrapavega (sivo) in dvema zatočiščema na gladkem dnu.

### 3.2.4 Potek individualnih poskusov

Pri preverjanju obeh tipov vedenja smo na osvetljeno podlago za petrijevke vsakič postavili po 20 petrijevk (4 vrste po 5 petrijevk). V vrste smo vodne osličke razporedili po spolu in ekomorfu: po 5 površinskih samcev, 5 podzemeljskih samcev, 5 površinskih samic in 5 podzemeljskih samic. V poskus smo sočasno vključili ali ekomorf s Planinskega polja in podzemeljske Pivke ali ekomorf s Cerkniskega polja in podzemeljskega Raka. Pri vsakem snemanju smo zamenjali položaj zgoraj naštetih vrst; npr. pri prvem snemanju je bila površinski samcem namenjena zgornja vrsta petrijevk na podlagi, pri drugem druga, pri tretjem tretja, pri četrtem pa spodnja vrsta, nakar smo vrstni red ponovili od začetka. Tako smo preprečili oziroma zmanjšali morebitne neželene sistematične vplive na opazovano vedenje. Vsakega oslička smo dali v ročno izdelan plastični obroček ( $2r = 2 \text{ cm}$ ,  $v = 2 \text{ cm}$ ) z žičnatim držalom, ki smo ga pri poskusu izbire hrapave podlage postavili na gladko polovico petrijevke, pri poskusu skrivanja v zatočišču pa na polovico brez zatočišča. Osličke smo pustili v obročkih približno 10 min, da so se umirili. Nato smo s pomočjo štirih vzdolžnih in dveh prečnih lesenih palic odstranili vseh 20 obročkov naenkrat, da so se oslički po petrijevkah začeli gibati sočasno (Slika 6), in začeli snemati njihovo vedenje. Vsako snemanje je trajalo 2 uri, video posnetke smo zajemali s programom VirtualDub 1.10.4 pri nastavitvi 5 slik na sekundo. Za oba tipa poskusa smo 4x ponovili dveurni cikel snemanja, da smo posneli oba tipa vedenja pri 20 samcih in 20 samicah iz vsake od 4 populacij. Med potekom poskusa smo zagotovili, da v laboratorij ni nihče vstopil in tako vznemiril živali ali povzročil spremembe v temperaturi ali svetlobi. Po koncu vsakega snemanja smo vse osebkne prenesli nazaj v petrijevke s hrano in ustrezno identifikacijsko oznako.





Slika 6: Začetek individualnega vedenjskega poskusa z vodnimi oslički. Osebki, ločeni po spolu in populaciji čakajo v obročkih, ki smo jih po 10 min hkrati dvignili iz petrijevk s pomočjo lesenih palic.

### 3.2.5 Potek skupinskih poskusov

Površinske vodne osličke smo opazovali pri beli svetlobi ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), podzemeljske pa v temi s pomočjo šibke rdeče ( $0,01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) naglavne svetilke Black Diamond ReVolt. Vsakič smo sočasno opazovali po 20 samcev v enem in po 20 samic v drugem akvariju. Osebke smo ločili po spolu, saj se je sicer vedenje vodnih osličkov spremenilo na račun iskanja partnerjev in nastanka prekopul. Pri prvem tipu poskusa (tj. akvarij z gladkim dnom in dvema zatočiščema) smo opazovali le osebke iz obeh površinskih populacij (Planinskega in Cerkniškega polja), pri drugem tipu poskusa (tj. akvarij s polovičnim hrapavim dnom in dvema zatočiščema na gladkem dnu) pa smo opazovali osebke iz ene površinske (Cerkniško polje) in ene podzemeljske populacije (Rak v Planinski jami). Pri vsakem poskusu smo vseh 20 osebkov prenesli v okroglo plastično ogrado na gladkem dnu, ki smo jo po 10 min odstranili, da so vsi oslički hkrati začeli s poskusom (Slika 7). Prve 3 ure smo na vsakih 10 min prešteli, koliko osebkov se nahaja v zatočišču in koliko prosto na hrapavem ali na gladkem dnu. Nato smo jih ponovno prešteli ob koncu poskusa, 24 ur po začetku.





Slika 7: Začetek skupinskega poskusa z vodnimi oslički. Oslički so na gladkem dnu omejeni s plastičnim obročem, ki smo ga po 10 min odstranili.

### 3.3 ANALIZA PODATKOV

#### 3.3.1 Pregledovanje video posnetkov

Vse video posnetke smo izvozili v AVI formatu in jih pregledali s programom BSPlayer 2.70, in sicer pri 5-krat povečani hitrosti predvajanja. Za vsak osebek smo pregledali celoten dveurni posnetek vedenja in na 5 s natančno zabeležili čase vseh prehodov iz ene na drugo polovico petrijevke. Kot zadrževanje na hrapavi polovici smo zabeležili že, če se je osebek vsaj z enim parom nog držal hrapave podlage. Zadrževanje na polovici petrijevke z zatočiščem pa smo zabeležili šele, če je bil osebek s celim telesom v zatočišču. Na podlagi tega smo lahko izračunali kolikokrat in koliko časa je osebek izkazoval opazovano vedenje, tj. izbira hrapave podlage oziroma skrivanje v zatočišču. Spremljali smo tudi stopnjo aktivnosti osebkov, ki smo jo beležili kot čas hoje in mirovanja. Mirovanje je pomenilo, da se osebek ni premaknil vsaj 5 min. Vse vrednosti smo zabeležili v tabele v programu Microsoft Excel, ki smo jih oblikovali tako, da so bile čim bolj uporabne za nadaljnje delo v programu R.

### 3.3.2 Statistična analiza podatkov

Vse statistične analize za individualne poskuse smo naredili v osnovnem paketu (stats) programa R 3.2.4 (R Core Team, 2016). Ker je bil odziv osebkov v prvih 30 min precej neustaljen, smo te podatke iz analiz izločili. Za preostalih 90 min smo sešteli čase zadrževanja osebkov na testni polovici (na hrapavi podlagi oziroma v zatočišču) in iz nadaljnje analize izločili osem osamelcev (ang. outliers), tj. podatkov z odmiki, večjimi od trikratnega interkvartilnega razmika (3Q). Pri poskusu izbire hrapave polovice smo izločili podatke za enega samca in eno samico s Planinskega polja, enega samca iz Pivke v Planinski jami in enega samca iz Raka v Planinski jami. Pri poskusu izbire zatočišča pa smo izločili podatke za dve samici s Planinskega polja ter enega samca in ene samice iz Pivke v Planinski jami. Predvidoma je na vedenje polovice izločenih osebkov iz obeh tipov individualnih poskusov vplivalo njihovo opaženo slabo fizično stanje (tj. manjkajoče okončine, prisotnost parazita, pogin kmalu po koncu poskusa). Pri vseh statističnih testih smo uporabili stopnjo tveganja 5 %.

S Shapiro-Wilkovim testom (W) smo testirali normalnost porazdelitve posamičnih populacij, ločenih po spolu. Glede na rezultate tega testa smo zanje izračunali osnovni statistiki: srednjo vrednost za čas zadrževanja na testni polovici in pripadajočo mero variabilnosti. Za normalno porazdeljene podatke (tj. pri poskusu skrivanja v zatočišču) smo torej izračunali aritmetično sredino in standardno deviacijo, za tiste, katerih porazdelitev ni bila normalna (tj. pri poskusu izbire hrapave podlage), pa mediano in interkvartilne razmike. Izračunali smo tudi deleže srednjih vrednosti zadrževanja na testni polovici glede na celotni čas opazovanja (tj. 90 min).

Da bi preverili, ali gre za naključno gibanje med obema polovicama petrijevke ali za značilno izbiro testne polovice, smo pri normalno porazdeljenih podatkih uporabili Studentov t-test, pri ostalih pa Wilcoxonov test vsote rangov ( $W_i$ ; običajni kratici smo dodali podpisani "i" za ločitev od Shapiro-Wilkove statistike), oba s Holmovim popravkom p-vrednosti. Z omenjenima testoma smo preverili, ali so srednje vrednosti značilno različne od polovice opazovanega časa (tj. 45 min).

Pri normalno porazdeljenih podatkih smo za nadaljnje analize uporabili samo podatke tistih populacij, ločenih po spolu, pri katerih je bila izbira testne polovice statistično značilna. Pri njih smo najprej z Bartlettovim testom preverili homogenost varianc. Nato smo izvedli dvosmerno analizo variance (ang. two-way ANOVA) in z njo preverili vpliv ekomorfa, spola ter njune interakcije glede na čas zadrževanja na testni polovici petrijevke. Za primerjave parov populacij, ločenih po spolu, smo naredili parne Studentove t-teste z združeno standardno deviacijo in Holmovim popravkom p-vrednosti.

Za podatke, ki niso bili porazdeljeni normalno, smo najprej z neparametričnim Kruskal-Wallisovim H testom preverili, ali se podatki po spolu ločenih populacij med seboj statistično razlikujejo. Nato smo za primerjavo podatkov med samci in samicami posameznih populacij opravili Fligner-Killeenov test homogenosti varianc s Holmovim popravkom p-vrednosti. Za iste primerjave smo naredili tudi dodatni Wilcoxonov test vsote rangov s Holmovim popravkom p-vrednosti. Glede na rezultate primerjav podatkov smo v primeru, da ni bilo statističnih razlik med spoloma istih populacij, združili podatke za samce in samice posameznih populacij ter ponovili vse analize, kot je opisano zgoraj. Združili smo tudi podatke za obe populaciji vsakega ekomorfa (Planinsko s Cerknjskim poljem in Pivko z Rakom v Planinski jami) ter ponovno ponovili zgoraj opisane analize.

Od podatkov o aktivnosti vodnih osličkov (trajanju hoje oz. mirovanja med poskusom) smo uporabili le podatke o skupnem času gibanja posameznih osebkov po hrapavi podlagi. Tako smo želeli preveriti, ali je bila izbira te podlage le posledica morebitnih razlik v stopnji gibalne aktivnosti med podzemeljskimi in površinskimi osebkami.

Vse grafikone kvantilov (t. i. okvire z ročaji, ang. box and whiskers plots) pri individualnih poskusih smo izrisali v R paketu ggplot2 (Wickham, 2009). Izrisali smo t. i. "Tukeyev grafikon kvantilov" (Field in sod., 2013), kjer spodnji in zgornji rob okvira prikazujeta prvi (Q1) in tretji kvartil (Q3), odebeljena črta v njem pa mediano. Prikazani sta tudi najnižja in najvišja vrednost znotraj 1,5 kvartilnega razmika ( $1,5Q$ ) od omenjenih kvartilov, do njiju segajo t. i. "ročaji" (navpični črti). Dodatno prikazane točke (●) so osamelci, ki so zunaj intervala ( $Q_1 - 1,5Q$ ,  $Q_3 + 1,5Q$ ), pri tem je  $Q = Q_3 - Q_1$ .

Podatke skupinskih poskusov smo analizirali le grafično s programom Microsoft Excel, ker jih nismo ponovili v zadostnem številu za statistično testiranje. Gibanje osebkov v prvih 3 urah poskusov smo prikazali z linijskim diagramom, nahajanje osebkov po preteku 24 ur pa smo prikazali s tortnimi diagrami.

## 4 REZULTATI

### 4.1 IZBIRA HRAPAVE PODLAGE PRI INDIVIDUALNIH POSKUSIH

#### 4.1.1 Zadrževanje na hrapavi podlagi

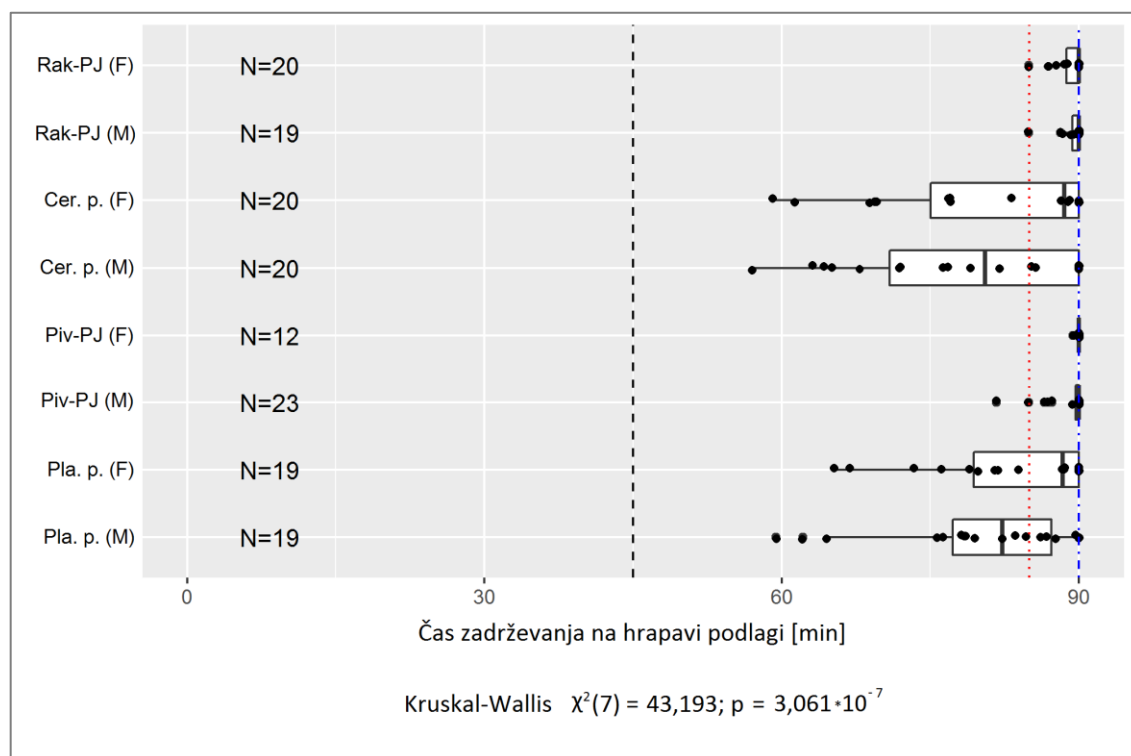
Seštevki časov zadrževanja na hrapavi podlagi po populaciji in spolu ločenih vodnih osličkov niso bili porazdeljeni normalno, vsi Shapiro-Wilkovi testi so bili namreč statistično značilni ( $p < 0,05$ ) (Preglednica 1).

Pri vseh zgoraj omenjenih osličkih je bil delež srednje vrednosti zadrževanja na hrapavi polovici glede na celotni čas opazovanja (rMe) zelo visok, torej so se večino časa zadrževali na njej (Preglednica 1). Samci in samice iz obeh podzemeljskih populacij so se tam zadrževali skoraj ves čas (rMe = 100 %). Najkrajši čas so tam preživel samci s Planinskega polja, povprečno okoli 82 od 90 min (rMe = 91,39 %). Variabilnost tega vedenja je bila največja med samci s Cerkniškega polja (interkvartilni razmik = kr = 19,1 min), najmanjša pa med samicami iz Pivke v Planinski jami (kr = 0 min) (Preglednica 1).

Samci in samice iz vseh populacij so aktivno izbrali hrapavo polovico, naključno izbiro smo zavrnili s statistično značilnimi Wilcoxonovimi testi vsote rangov ( $p < 0,05$ ) (Preglednica 1). Čas zadrževanja na hrapavi polovici se je med populacijami statistično značilno razlikoval (Slika 8, Kruskal-Wallisov test).

Preglednica 1: Osnovne statistike in rezultati Shapiro-Wilkovega testa normalnosti (W) in Wilcoxonovega testa vsote rangov ( $W_i$ ) za vodne osličke, ločene po populaciji in spolu. N = število osebkov, Me = mediana, rMe = delež mediane glede na čas opazovanja (90 min), kr = interkvartilni razmik; Pla. p. = Planinsko polje, Cer. p. = Cerkniško polje, Piv-PJ = Pivka v Planinski jami, Rak-PJ = Rak v Planinski jami, F = samice, M = samci.

Populacija	N	Me [min]	rMe [%]	kr [min]	Shapiro-Wilkov test		Wilcoxonov test	
					W	p	$W_i$	p
Pla. p. (M)	19	82,25	91,39	9,96	0,87	0,014	190	0,001
Pla. p. (F)	19	88,33	98,15	10,63	0,813	0,002	190	0,001
Piv-PJ (M)	23	90	100	0,33	0,56	< 0,001	276	< 0,001
Piv-PJ (F)	12	90	100	0	0,327	< 0,001	78	0,001
Cer. p. (M)	20	80,54	89,49	19,10	0,876	0,015	210	0,001
Cer. p. (F)	20	88,54	98,38	14,98	0,789	< 0,001	210	0,001
Rak-PJ (M)	19	90	100	0,67	0,58	< 0,001	190	0,001
Rak-PJ (F)	20	90	100	1,25	0,634	< 0,001	210	< 0,001



Slika 8: Čas zadrževanja po spolu ločenih populacij vodnih osličkov na hrapavi podlagi in Kruskal-Wallisova H statistika. Črna prekinjena črta = polovica trajanja opazovanja, rdeča prekinjena črta = aritmetična sredina vseh meritev, modra prekinjena črta = mediana vseh meritev. Pla. p. = Planinsko polje, Cer. p. = Cerkniško polje, Piv-PJ = Pivka v Planinski jami, Rak-PJ = Rak v Planinski jami, F = samice, M = samci, N = število osebkov.

Ker se samci in samice iz posameznih populacij niso razlikovali glede na čas zadrževanja na hrapavi polovici petrijevke (Preglednica 2: dodatni Wilcoxonov test), njihove variance pa so bile homogene (Preglednica 2: Fligner-Killeenov test), smo podatke zanje združili. Zgoraj naštete statistične analize smo nato ponovili na podatkih, združenih po populaciji.

Preglednica 2: Rezultati Fligner-Killeenovega testa homogenosti varianc ( $\chi^2$ ) in dodatnega Wilcoxonovega testa vsote rangov ( $W_i$ ) pri primerjavi populacij vodnega oslička, ločenih po spolu. Pla. p. = Planinsko polje, Cer. p. = Cerkniško polje, Piv-PJ = Pivka v Planinski jami, Rak-PJ = Rak v Planinski jami, F = samice, M = samci.

Populacija (spol)	Fligner-Killeenov test		Wilcoxonov test	
	$\chi^2$	p	$W_i$	p
Pla. p. (M) – Pla. p. (F)	0,259	1,0	134,5	0,717
Piv-PJ (M) – Piv-PJ (F)	2,095	0,591	110,5	0,717
Cer. p. (M) – Cer. p. (F)	0,162	1,0	174	0,957
Rak-PJ (M) – Rak-PJ (F)	0,005	1,0	186,5	0,957

Seštevki časov zadrževanja po populaciji združenih vodnih osličkov na hrapavi podlagi niso bili razporejeni normalno, vsi Shapiro-Wilkovi testi so bili ponovno statistično značilni ( $p < 0,05$ ) (Preglednica 3). Pri vseh populacijah je bil delež srednje vrednosti zadrževanja na hrapavi polovici glede na celotni čas opazovanja (rMe) zelo visok, torej so se večino časa zadrževali na njej (Preglednica 3). Najdlje so se tam zadrževali osebki iz obeh podzemeljskih populacij (rMe = 100 %). Najkrajši čas so tam preživel osebki s Planinskega polja (rMe = 93,06 %), povprečno okoli 84 od 90 min. Variabilnost je bila največja pri osebkih s Cerknškega polja (kr = 18,67 min), najmanjša pa pri osebkih iz Pivke v Planinski jami (kr = 0 min) (Preglednica 3).

Osebki iz vseh populacij so izbrali hrapavo polovico, naključno izbiro smo zavrnilo s statistično značilnimi Wilcoxonovimi testi vsote rangov ( $p < 0,05$ ) (Preglednica 3). Čas zadrževanja na hrapavi polovici se je med populacijami statistično značilno razlikoval (Slika 9, Kruskal-Wallisov test).

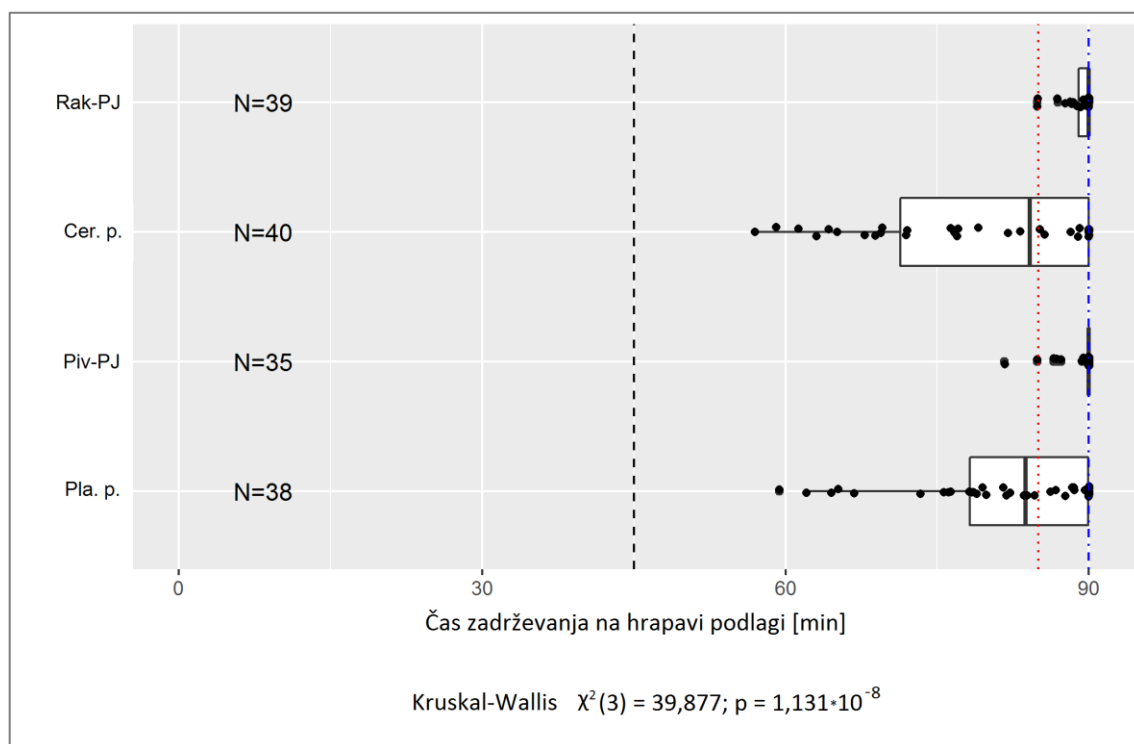
Preglednica 3: Osnovne statistike in rezultati Shapiro-Wilkovega testa normalnosti (W) in Wilcoxonovega testa vsote rangov ( $W_i$ ) za vodne osličke, ločene po populacijah. N = število osebkov, Me = mediana, rMe = delež mediane glede na čas opazovanja (90 min), kr = interkvartilni razmik; Pla. p. = Planinsko polje, Cer. p. = Cerknško polje, Piv-PJ = Pivka v Planinski jami, Rak-PJ = Rak v Planinski jami.

Populacija	N	Me [min]	rMe [%]	kr [min]	Shapiro-Wilkov test		Wilcoxonov test	
					W	p	$W_i$	p
Pla. p.	38	83,75	93,06	11,69	0,852	< 0,001	741	< 0,001
Piv-PJ	35	90	100	0	0,454	< 0,001	630	< 0,001
Cer. p.	40	84,17	93,52	18,67	0,836	< 0,001	820	< 0,001
Rak-PJ	39	90	100	1	0,611	< 0,001	780	< 0,001

Ker se osebki istega ekomorfa iz različnih populacij niso razlikovali po času zadrževanja na hrapavi polovici petrijevke (Preglednica 4: dodatni Wilcoxonov test), njihove variance pa so bile homogene (Preglednica 4: Fligner-Killeenov test), smo podatke združili še po ekomorfu. Nato smo zgoraj naštetih statističnih analiz ponovili še na omenjenih združenih podatkih.

Preglednica 4: Rezultati Fligner-Killeenovega testa homogenosti varianc ( $\chi^2$ ) in dodatnega Wilcoxonovega testa vsote rangov ( $W_i$ ) pri primerjavi površinskih in podzemeljskih populacij vodnega oslička. Pla. p. = Planinsko polje, Cer. p. = Cerknško polje, Piv-PJ = Pivka v Planinski jami, Rak-PJ = Rak v Planinski jami.

Populacija	Fligner-Killeenov test		Wilcoxonov test	
	$\chi^2$	p	$W_i$	p
Pla. p. – Cer. p.	2,037	0,307	774,5	0,887
Piv-PJ – Rak-PJ	0,487	0,485	759	0,585



Slika 9: Čas zadrževanja površinskih in podzemeljskih populacij vodnega oslička na hrapavi podlagi in Kruskal-Wallisova H statistika. Črna prekinjena črta = polovica trajanja opazovanja, rdeča prekinjena črta = aritmetična sredina vseh meritev, modra prekinjena črta = mediana vseh meritev. Pla. p. = Planinsko polje, Cer. p. = Cerkniško polje, Piv-PJ = Pivka v Planinski jami, Rak-PJ = Rak v Planinski jami, N = število osebkov.

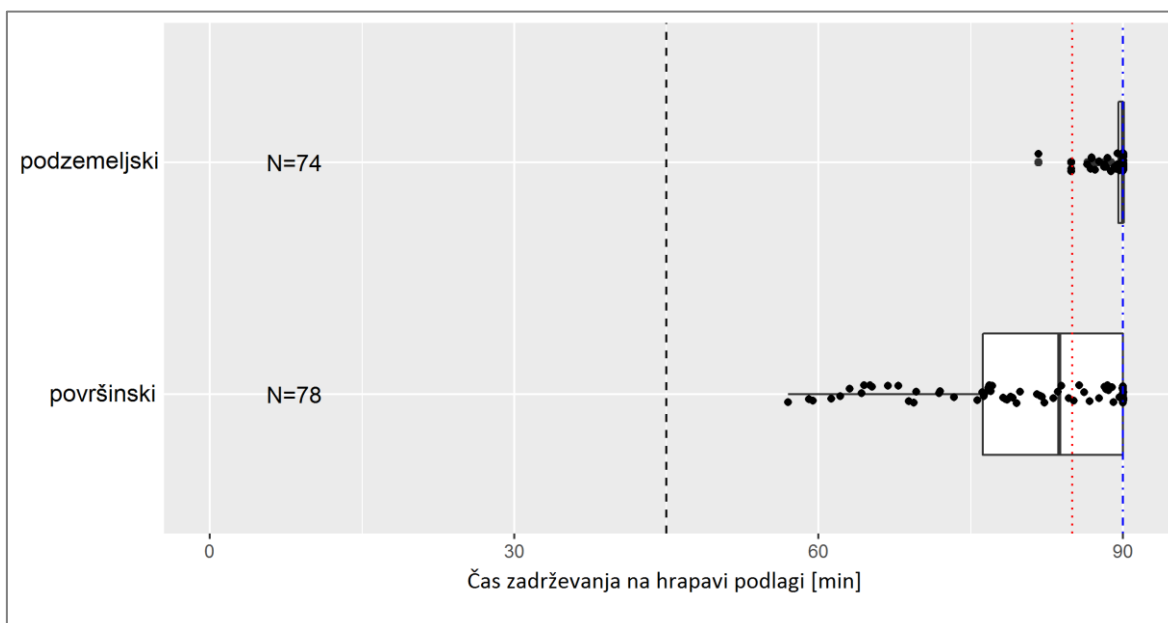
Seštevki časov zadrževanja po ekomorfu ločenih vodnih osličkov na hrapavi podlagi niso bili porazdeljeni normalno, Shapiro-Wilkovi testi so bili namreč statistično značilni ( $p < 0,05$ ) (Preglednica 5).

Pri obeh ekomorfh je bil delež srednje vrednosti zadrževanja na hrapavi polovici glede na celotni čas opazovanja (rMe) zelo visok, torej so se vsi večino časa zadrževali na njej (Preglednica 5). Podzemeljski osebki so se tam zadrževali dlje (rMe = 100 %) kot površinski (rMe = 93,06 %). Variabilnost opazovanega vedenja je bila večja pri površinskih (kr = 13,79 min) kot pri podzemeljskih osebkih (kr = 0 min) (Preglednica 5).

Osebki obeh ekomorfov so aktivno izbrali hrapavo polovico, naključno izbiro smo zavrnili s statistično značilnimi Wilcoxonovimi testi vsote rangov ( $p < 0,05$ ) (Preglednica 5). Osebki obeh ekomorfov so se po času zadrževanja na hrapavi polovici petrijevke medsebojno statistično razlikovali (Slika 10, Preglednica 6: dodatni Wilcoxonov test), njihove variance pa niso bile homogene (Preglednica 6: Fligner-Killeenov test).

Preglednica 5: Osnovne statistike in rezultati Shapiro-Wilkovega testa normalnosti (W) in Wilcoxonovega testa vsote rangov ( $W_i$ ) za vodne osličke, ločene po ekomorfu. N = število osebkov, Me = mediana, rMe = delež mediane glede na čas opazovanja (90 min), kr = interkvartilni razmik.

Ekomorf	N	Me [min]	rMe [%]	kr [min]	Shapiro-Wilkov test		Wilcoxonov test	
					W	p	$W_i$	p
površinski	78	83,75	93,06	13,79	0,848	< 0,001	3081	< 0,001
podzemeljski	74	90	100	0,46	0,53	< 0,001	2775	< 0,001



Slika 10: Čas zadrževanja obeh ekomorfov vodnih osličkov na hrapavi podlagi. Črna prekinjena črta = polovica trajanja opazovanja, rdeča prekinjena črta = aritmetična sredina vseh meritev, modra prekinjena črta = mediana vseh meritev; N = število osebkov.

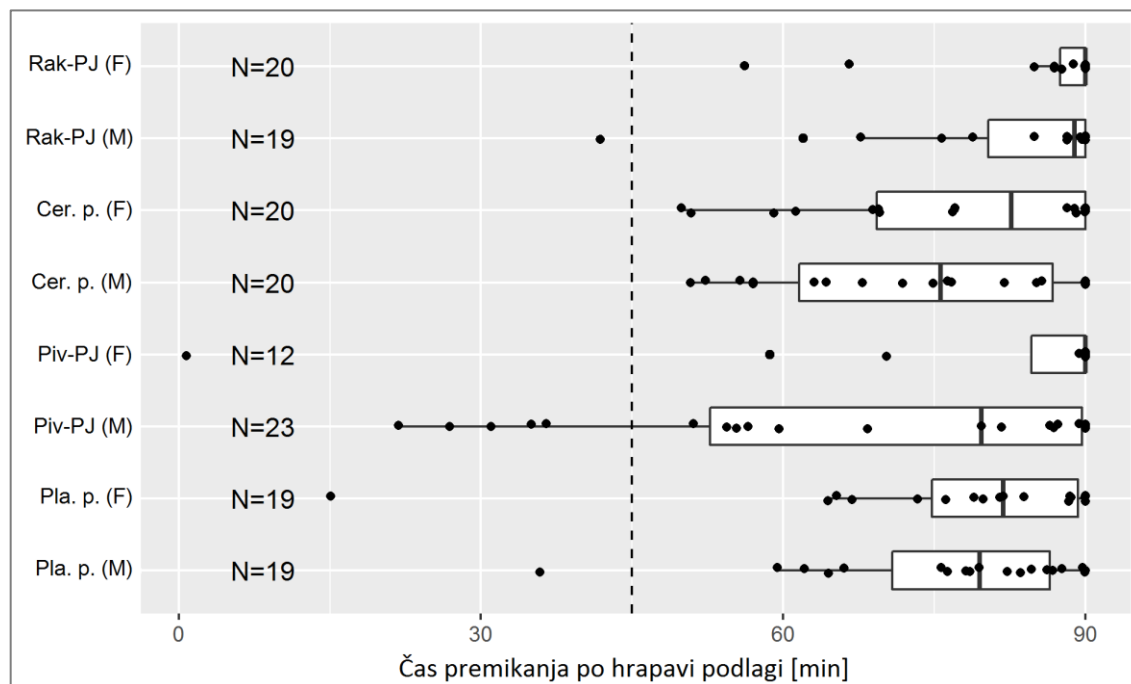
Preglednica 6: Rezultati Fligner-Killeenovega testa homogenosti varianc ( $\chi^2$ ) in dodatnega Wilcoxonovega testa vsote rangov ( $W_i$ ) pri primerjavi obeh ekomorfov vodnega oslička.

Ekomorf	Fligner-Killeenov test		Wilcoxonov test	
	$\chi^2$	p	$W_i$	p
površinski – podzemeljski	82,11	$1,284 \cdot 10^{-19}$	1309	$3,657 \cdot 10^{-10}$



#### 4.1.2 Aktivnost vodnih osličkov

Ker smo z analizo časa, preživetega na hrapavi in gladki polovici petrijevke, dokazali statistično značilno izbiro hrapave polovice, smo čas, preživet na gladki polovici, izvzeli iz nadaljnje analize aktivnosti osebkov. Iz časa aktivnega gibanja osebkov po hrapavi polovici (Slika 11) lahko razberemo, da so tako površinski kot podzemeljski samci in samice večino časa po tej polovici hodili in ne mirovali.



Slika 11: Čas aktivnega premikanja vodnih osličkov po hrapavi podlagi za populacije, ločene po spolu. Črna prekinjena črta je polovica trajanja opazovanja. Pla. p. = Planinsko polje, Cer. p. = Cerkniško polje, Piv-PJ = Pivka v Planinski jami, Rak-PJ = Rak v Planinski jami, F = samice, M = samci, N = število osebkov.

## 4.2 IZBIRA ZATOČIŠČA PRI INDIVIDUALNIH POSKUSIH

### 4.2.1 Zadrževanje v zatočišču

Seštevki časov zadrževanja po populaciji in spolu ločenih vodnih osličkov v zatočišču so bili razporejeni normalno, Shapiro-Wilkovi testi namreč niso bili statistično značilni ( $p < 0,05$ ) (Preglednica 7).

Nekatere po spolu ločene populacije vodnih osličkov so se več časa zadrževale na polovici z zatočiščem, nekatere pa na polovici brez zatočišča (Preglednica 7, Slika 12). Najdlje so se v zatočišču zadrževale samice iz Raka v Planinski jami ( $rAr = 63,36\%$ ), povprečno okoli 57 od 90 min. Najkrajši čas so tam preživel samci iz Pivke v Planinski jami ( $rAr = 24,6\%$ ),

povprečno okoli 22 od 90 min. Variabilnost tega vedenja je bila največja pri samcih iz Raka v Planinski jami (SD = 28,02 min) in najmanjša pri samcih iz Pivke v Planinski jami (SD = 11,8 min) (Preglednica 7).

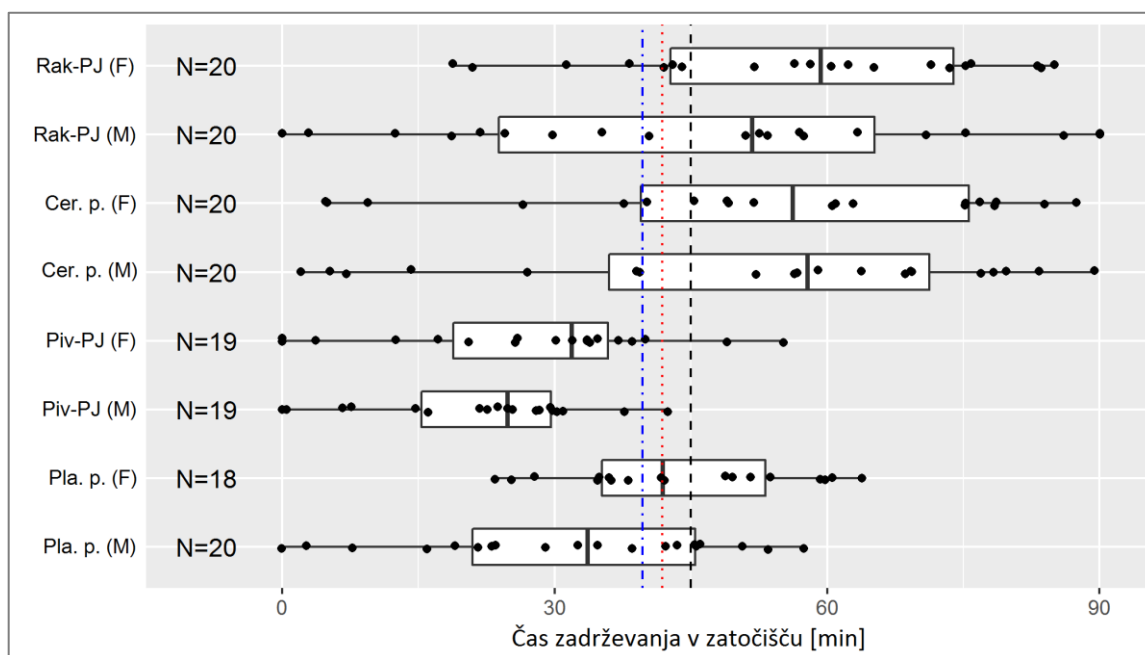
Rezultati Studentovega t-testa (Preglednica 7) kažejo, da so samci s Planinskega polja ter samci in samice iz Pivke v Planinski jami statistično značilno izbirali polovico petrijevke brez zatočišča ( $p < 0,05$ ), osebki iz preostalih populacij, ločenih po spolu, pa so se po petrijevki gibali naključno (njihova izbira ene od polovic ni bila statistično značilna;  $p > 0,05$ ). Nadaljnje analize smo izvedli samo za oba spola populacij Planinsko polje in Pivka v Planinski jami.

Preglednica 7: Osnovne statistike in rezultati Shapiro-Wilkovega testa normalnosti (W) in Studentovega t-testa za vodne osličke, ločene po populaciji in spolu. N = število osebkov, Ar = aritmetična sredina, rAr = delež aritmetične sredine glede na čas opazovanja (90 min), SD = standardna deviacija; Pla. p. = Planinsko polje, Cer. p. = Cerkniško polje, Piv-PJ = Pivka v Planinski jami, Rak-PJ = Rak v Planinski jami, F = samice, M = samci.

Populacija	N	Ar [min]	rAr [%]	SD [min]	Shapiro-Wilk test		Student t test	
					W	p	t	p
Pla. p. (M)	20	31,64	35,15	16,96	0,955	0,447	-3,522	0,014
Pla. p. (F)	18	43,75	48,61	12,66	0,949	0,403	-0,42	1,0
Piv-PJ (M)	19	22,14	24,60	11,80	0,939	0,25	-8,446	< 0,001
Piv-PJ (F)	19	27,52	30,58	15,38	0,945	0,324	-4,955	0,001
Cer. p. (M)	20	51,84	57,60	27,76	0,909	0,062	1,102	0,853
Cer. p. (F)	20	52,94	58,82	26,10	0,917	0,089	1,361	0,758
Rak-PJ (M)	20	46,63	51,81	28,02	0,959	0,524	0,26	1,0
Rak-PJ (F)	20	57,03	63,36	20,31	0,949	0,356	2,647	0,079

Rezultati Bartlettovega testa za vodne osličke s Planinskega polja in Pivke v Planinski jami, ločene po spolu, niso pokazali statistično značilnih razlik med variancami ( $K^2 = 3,007$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0,391$ ). Pri dvosmerni analizi variance interakcija med spremenljivkama ekomorf in spol ni bila statistično značilna ( $F = 1,033$ ,  $p = 0,313$ ), zato smo njen vpliv izpustili iz nadaljnje analize (Preglednica 8). Vpliv obeh posameznih spremenljivk je bil značilen (ekomorf:  $F = 14,912$ ,  $p = 0,0002$ ; spol:  $F = 6,454$ ,  $p = 0,013$ ) (Preglednica 8).

Rezultati Studentovega t-testa z združeno standardno deviacijo (Preglednica 9) so pokazali statistično značilne razlike med samci in samicami s Planinskega polja (mejna vrednost) ter med samicami s Planinskega polja ter samicami iz Pivke v Planinski jami.



Slika 12: Čas zadrževanja vodnih osličkov v zatočišču za populacije, ločene po spolu. Črna prekinjena črta = polovica trajanja opazovanja, rdeča prekinjena črta = aritmetična sredina vseh meritev, modra prekinjena črta = mediana vseh meritev. Pla. p. = Planinsko polje, Cer. p. = Cerkniško polje, Piv-PJ = Pivka v Planinski jami, Rak-PJ = Rak v Planinski jami, F = samice, M = samci, N = število osebkov.

Preglednica 8: Rezultati dvosmerne analize variance za populaciji Planinsko polje in Pivka v Planinski jami, ločeni po spolu.

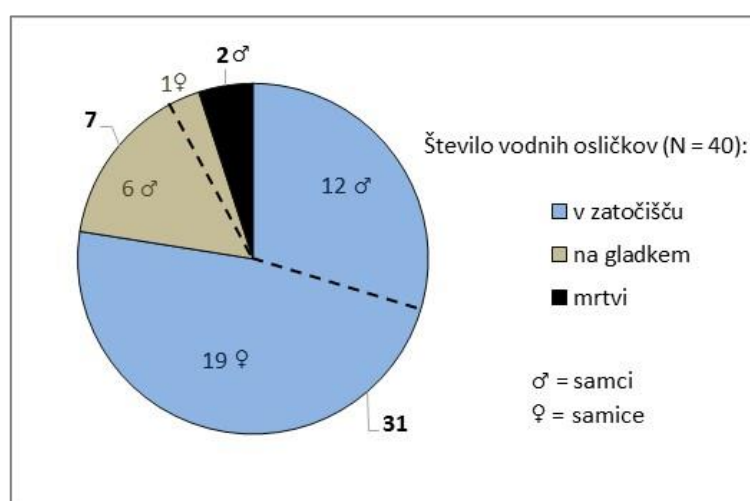
	stopinje prostosti	vsota kvadratov	povprečni kvadrat	F	p
ekomorf	1	11150862	11150862	14,912	0,0002
spol	1	4826265	4826265	6,454	0,013
ekomorf : spol	1	772199	772199	1,033	0,313
ostanki	72	53840603	747786		

Preglednica 9: Rezultati Studentovega t-testa z združeno standardno deviacijo za primerjavo vodnih osličkov s Planinskega polja in Pivke v Planinski jami, ločenih po spolu. Pla. p. = Planinsko polje, Piv-PJ = Pivka v Planinski jami, F = samice, M = samci.

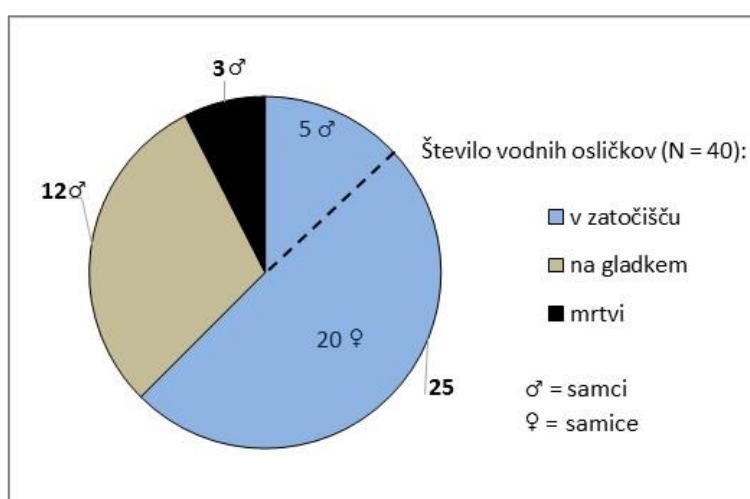
Populacija (spol)	Studentov t-test		
	t	df	p
Pla. p. (M) – Pla. p. (F)	2,51	34,87	0,051
Piv-PJ (M) – Piv-PJ (F)	1,21	33,74	0,235
Pla. p. (M) – Piv-PJ (M)	-2,04	34,0	0,099
Pla. p. (F) – Piv-PJ (F)	-3,51	34,36	0,005

### 4.3 SKUPINSKI POSKUSI Z VODNIMI OSLIČKI

Vodni oslički so se v prvih treh urah vseh skupinskih poskusov gibali naključno in se niso umirili v zatočišču, zato je bila natančnejša obdelava teh podatkov nesmiselna. Na Sliki C1 v Prilogi C je prikazan časovni potek števila vodnih osličkov s Cerkniskega polja na različnih delih akvarija s hrapavo polovico in gladko polovico z dvema zatočiščema. Po 24 urah se je večina osličkov umirila na določenem delu akvarija. Pri poskusu z dvema zatočiščema na gladkem dnu (prvi tip poskusa), je bila po enem dnevu pri obeh površinskih populacijah več kot polovica osebkov v zatočiščih: pri osebkih s Planinskega polja 78 % (Slika 13), pri tistih s Cerkniskega polja pa 63 % (Slika 14). Preostali so bili na gladkem dnu.



Slika 13: Razporeditev vodnih osličkov s Planinskega polja v akvariju z gladkim dnom in dvema zatočiščema po 24 urah skupinskega poskusa. V akvariju je bilo naenkrat po 20 samcev ali samic. N = skupno število osebkov (samci + samice).



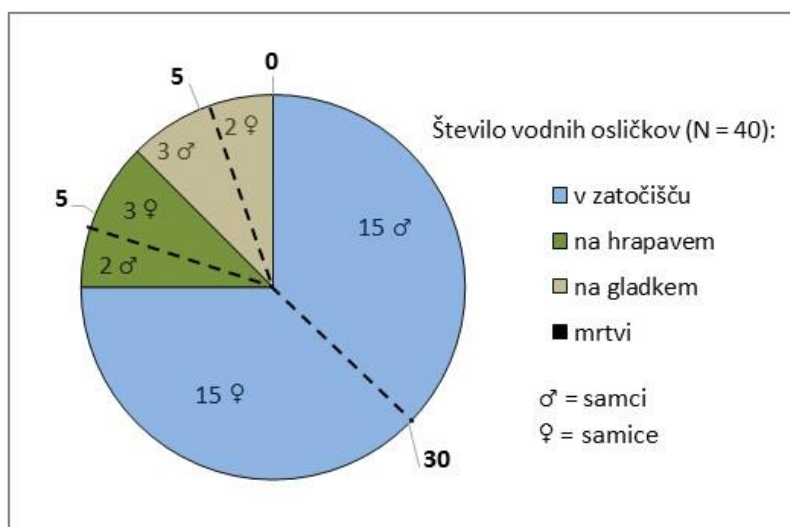
Slika 14: Razporeditev vodnih osličkov s Cerkniskega polja v akvariju z gladkim dnom in dvema zatočiščema po 24 urah skupinskega poskusa. V akvariju je bilo naenkrat po 20 samcev ali samic. N = skupno število osebkov (samci + samice).

Pri obeh populacijah smo opazili tudi pojav neenakomernega združevanja v zatočiščih (npr. Slika 18B). Pri samcih s Planinskega polja se je v enem zatočišču tesno skupaj držalo 9 osebkov, v drugem pa le trije, pri samicah je bilo v enem zatočišču 16, v drugem pa le trije osebki. Pri samcih s Cerkniskega polja sta se v enem zatočišču nahajala dva, v drugem trije osebki, preostali so bili na gladki podlagi, kjer se je večina prehranjevala s tremi poginulimi samci. Pri samicah s Cerkniskega polja se je v enem zatočišču stiskalo 16 osebkov (Slika 15), v drugem pa le 4 osebki, nobene samice ni bilo na gladki podlagi.

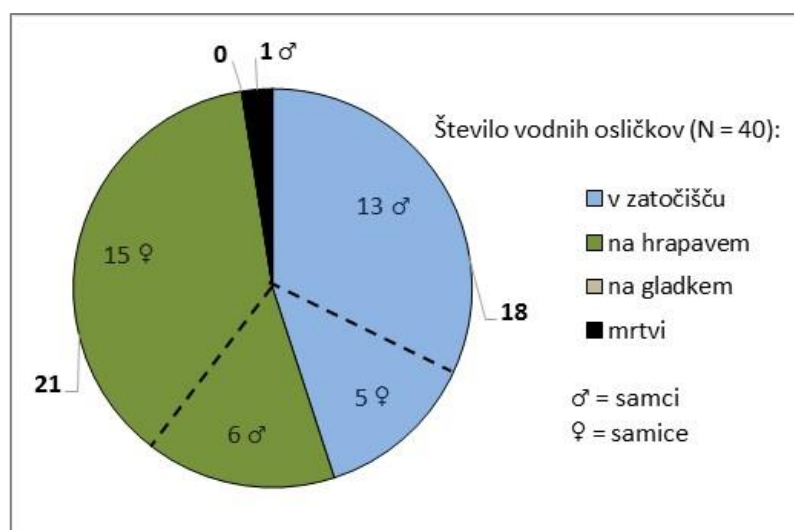


Slika 15: Zbiranje samic vodnih osličkov s Planinskega polja (A) in Cerkniskega polja (B) v enem od zatočišč v akvariju z gladkim dnom in dvema zatočiščema, po 24 urah skupinskega poskusa.

Pri poskusu z dvema zatočiščema na gladkem dnu in s hrapavo podlago na drugi polovici akvarija (drugi tip poskusa), je bila po 24 urah pri površinski populaciji (Cerknisko polje) več kot polovica osebkov v zatočiščih (75 %), na hrapavi podlagi je bilo le 13 % osebkov, preostali osebki pa so bili na gladki podlagi (Slika 16). Pri podzemeljski populaciji (Rak v Planinski jami) je bila v zatočišču manj kot polovica osebkov (45 %), prosto na hrapavem dnu pa je bilo preostalih 53 % osebkov; en osebek je poginil (Slika 17).



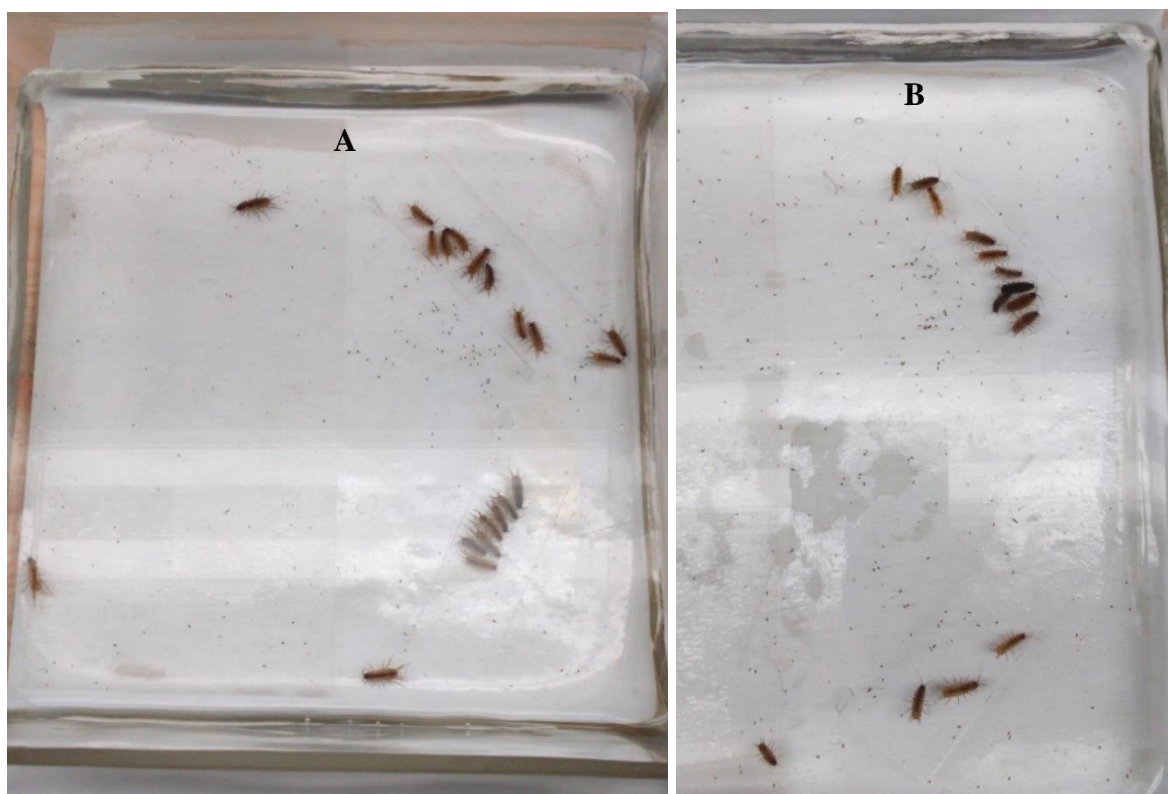
Slika 16: Razporeditev vodnih osličkov s Cerkniskega polja v akvariju s hrapavo polovico in gladko polovico z dvema zatočiščema po 24 urah skupinskega poskusa. V akvariju je bilo naenkrat po 20 samcev ali samic. N = skupno število osebkov (samci + samice).



Slika 17: Razporeditev vodnih osličkov iz Raka v Planinski jami v akvariju s hrapavo polovico in gladko polovico z dvema zatočiščema po 24 urah skupinskega poskusa. V akvariju je bilo naenkrat po 20 samcev ali samic. N = skupno število osebkov (samci + samice).

Tudi pri tem poskusu smo opazili neenakomerno združevanje v zatočiščih, a manj izrazito kot pri prvem tipu poskusa. Pri površinskih samcih se je v enem zatočišču zbralo 7, v drugem pa 8 osebkov (Slika 18A), pri samicah pa se je v enem zatočišču zbralo 11, v drugem pa le 4 osebkovi (Slika 18B). Pri podzemeljskih samcih je bilo po enem dnevu v enem zatočišču 8, v drugem pa 5 osebkov, pri samicah pa v enem zatočišču 5 osebkov, v drugem pa nobenega.





Slika 18: Skupinski poskus z vodnimi oslički s Cerknškega polja v akvariju s hrapavo in gladko polovico, pri katerem se je po 24 urah večino samic (A) in samcev (B) zbralo v obeh zatočiščih.

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 INDIVIDUALNA IZBIRA HRAPAVE PODLAGE PRI VODNEM OSLIČKU

Med površinskimi in podzemeljskimi vodnimi oslički smo opazili vedenjske razlike predvsem pri izbiri tipa podlage. Da je ta za vodne nevretenčarje pomemben, so doslej ugotovili tako z nekaterimi terenskimi (Barnes in sod., 2013; Becerra-Muñoz in Schramm, 2007) kot laboratorijskimi raziskavami (Kley in sod., 2009; Long in sod., 2011). Kley in sod. (2009) so na primer ugotovili, da so za izbiro podlage pri postranicah iz rodu *Gammarus* pomembni velikost delcev, velikost por med delci in strukturiranost listov potopljenih rastlin. Vpliv substrata na strukturo združbe sladkovodnih rakov enakonožcev, med katere sodi tudi vodni osliček, so proučevali Cuffney in sod. (1984), Holomuzki in Short (1988) in Zhao in sod. (2007). Slednji so ugotovili, da ima tip podlage v potoku velik vpliv na številčnost raka *Lirceus fontinalis* Rafinesque-Schmaltz, 1820; največjo številčnost so opazili na kamnih, poraslih z algami, manjšo na neporaslih kamnih, najmanjšo pa na muljnatem in peščenem dnu.

Sladkovodni raki enakonožci so bentoški detritivori, ki večinoma poseljujejo plitvejša jezera, ribnikov ali mirnejše predele tekočih voda, kjer se hranijo z razkrajajočo alohtono in avtohtono vegetacijo (Cuffney in sod., 1984; Findlay in sod. 1986). Za bentoške nevretenčarje, ki po podlagi izključno ali večinoma hodijo, je še posebej pomembno, da podlaga omogoča dober oprijem in s tem normalno koordinacijo gibanja ter manjšo možnost odplavljenja (Long in sod., 2011; Williams in Mundie, 1978). Ob tem je presenetljiva izjemna redkost opozoril o nujnosti zagotavljanja primerne (tj. ne gladke) podlage v vedenjskih poskusih z bentoškimi živalmi (npr. Lagerspetz in Vainio, 2006). Še vedno je namreč pogosta izvedba tovrstnih poskusov v posodah z gladkim dnom (npr. Janzer in Ludwig, 1952; Harris in sod., 2011; Augusiak in sod., 2015). Glede na rezultate naših poskusov menimo, da hoja po gladki podlagi med poskusom za te živali pomeni dodaten stres, kar lahko privede do delno ali povsem napačnih rezultatov.

Nedvoumna izbira hrapave podlage pri površinskih in podzemeljskih vodnih osličkih v naši raziskavi je potrdila njen pomen za oba ekomorfa. Za vodne osličke tega doslej ni nihče izpostavil. Zgolj posreden sklep o pomenu hrapave podlage za površinske vodne osličke bi bilo možno postaviti na podlagi objave Peetersa in sod. (2002), ki so pri njih opazovali vpliv peščene podlage napram prodnikom. Ugotovili so, da je tip podlage za vodne osličke pomemben, saj vpliva na njihovo rast, smrtnost in vedenje; niso pa preverili (ne)primernosti gladke podlage, saj jih na njej niso opazovali.

Pri naših poskusih smo tako pri površinskih kot podzemeljskih vodnih osličkih opazili, da so se med gibanjem po gladki podlagi večino časa tiščali ob steno petrijevke, njihovo gibanje pa je bilo negotovo in nerodno ter je včasih celo spominjalo na plavanje. To je v skladu z



opažanji raziskave Starryja in sod. (1998), ki so pri postranicah vrste *Gammarus roeseli* (Gervais, 1835) ugotovili, da te ob odsotnosti naravne podlage (proda in peska) plavajo več časa kot običajno in se pogosteje zadržujejo ob robovih akvarija. Ob prisotnosti strukturirane podlage so se večino časa skrivale v porah nesprijetega sedimenta (v intersticiju), še posebej ob prisotnosti plenilskih vrst rib. Ker postranice za razliko od vodnih osličkov ne hodijo, ampak večinoma plavajo, menimo, da je ustrezna podlaga za slednje toliko bolj pomembna.

Pri podzemeljskih vodnih osličkih je bila nezmožnost normalne hoje po gladki podlagi zaradi njihovih podaljšanih nog še posebej izrazita. Opažena nemoč in stres podzemeljskih vodnih osličkov sta se izrazila tudi v statistično značilnem daljšem času zadrževanja na hrapavi podlagi. Neredki osebki so se je krčevito oprijemali le z enim parom nog, vendar je niso zapustili kljub sočasnemu otipavanju gladke polovice z ostalimi nogami. Izrazitejša potreba tega ekomorfa po oprijemu je bila pričakovana. Čeprav so tekoče vode naravno okolje obeh ekomorfov in je oprijem podlage zanju pomemben, da osebki ne odnese vodni tok (Peeters in sod., 2002), je selekcijski pritisk vodnega toka v podzemlju predvidoma močnejši. Ob močnem toku bi lahko namreč podzemeljske osebke odplavilo proti ali na površje, kjer sta prisotna močnejša kompeticija in predacija, predvidoma glavna dejavnika, ki onemogočata preživetje podzemeljskih vrst na površju (Sket, 2008).

Opaženi vzorec izbire podlage se sklada tudi s terenskimi opažanji. Površinske vodne osličke smo namreč ob vzorčenjih največkrat opazili hoditi ali se oprijemati razkrajajočega se rastlinja na muljnatem dnu mirnih delov vodotoka (Prevorčnik, ustno). Tudi ostali viri kot habitat površinskih vodnih osličkov navajajo počasi tekoče nižinske vodotoke ali pa stoječe vode (Pârvulescu, 2009). Za razliko od njih so bili podzemeljski vodni oslički množični na skalnato-kamnitih odsekih, kjer so tudi v zelo močnem vodnem toku na brzicah hodili ali pa se trdno držali izpostavljenih ploskev skal (Trontelj, Kuralt, Fišer Ž. in Prevorčnik, ustno).

Z dodatnim beleženjem trajanja hoje in mirovanja med individualnimi poskusi smo potrdili, da čas zadrževanja na hrapavi podlagi pri podzemeljskih vodnih osličkih ni bil precenjen. Tak učinek bi namreč lahko imela gibalna neaktivnost (mirovanje) podzemeljskih osličkov; po izbiri hrapave polovice bi imeli ti bistveno manjšo možnost ponovne izbire gladke polovice kot gibalno aktivnejši površinski osebki. Tako kot površinski so se tudi podzemeljski oslički po hrapavi podlagi večino časa gibali, čeprav nekoliko počasneje. Slednje ni presenetljivo, saj je upočasnjena presnova (metabolizem) podzemeljskih živali ena od pomembnih prilagoditev na pomanjkanje hranil v podzemlju, ki se med drugim odraža v zmanjšani gibalni aktivnosti teh živali (Wilhelm in sod., 2006; Hüppop, 2012). Menimo, da razlika v hitrosti gibanja ni bila tolikšna, da bi vplivala na opažene razlike v izbiri hrapave podlage pri obeh ekomorfih.

Čeprav so se površinski in podzemeljski oslički medsebojno razlikovali glede na njihovo izbiro podlage, temu dejavniku ne pripisujemo prispevka k celokupni reproduktivni izolaciji

med njimi. Nekoliko izrazitejša izbira hrapave podlage pri podzemeljskih osebkih namreč sama po sebi ne more predstavljati bariere genskemu pretoku med obema ekomorfoma. Kot reproduktivna bariera je smiselna le ob predvidevanju, da so podzemeljski oslički zaradi izrazitejše potrebe po oprijemu sposobnejši obstati v okolju s hitrejšim in nepredvidljivejšim vodnim tokom, ki so mu v podzemlju izpostavljeni. Za preverjanje tega bi bilo treba opazovati vpliv vodnega toka na površinske in podzemeljske vodne osličke, ki bi se oprijemali enake hrapave podlage. Podobne poskuse so izvedli že Peeters in sod. (2002), a le s površinskimi vodnimi oslički. Rezultati njihove raziskave kažejo, da lahko pri najbolj hrapavem in strukturiranem substratu (produ) osebki ostanejo oprijeti na podlagi tudi v zelo močnem vodnem toku ter da ima tip substrata vpliv na porazdelitev osebkov v prostoru.

## 5.2 INDIVIDUALNA IZBIRA ZATOČIŠČA PRI VODNEM OSLIČKU

Skrivanje v zatočišču za večino vodnih nevretenčarjev pomeni povečanje verjetnosti preživetja, še posebej ob stohastičnih okoljskih motnjah, kot so na primer poplave in povečana prisotnost plenilcev (Williams in Moore, 1982; Fingerut in sod., 2015). Ob tem seveda obstajajo tudi negativne posledice skrivanja, kot sta zmanjšanje možnosti prehranjevanja in iskanja partnerja (Harris in sod., 2011). Starry in sod. (1998) so dokazali, da se postranice vrste *Gammarus roeseli* tako ob dejanski prisotnosti plenilskih rib kot tudi ob prisotnosti za njih značilnih kemičnih dražljajev (kairomonov) v vodi, nemudoma skrijejo v substrat (prodni intersticij).

Glede na zgoraj naštetá opažanja in pa poskus, ki sta ga izvedla Janzer in Ludwig (1952) s površinskimi vodnimi oslički, smo zanje predvideli hitro in izrazito skrivanje v zatočišče. V nasprotju s predvidevanji pa se v naših poskusih površinski vodni oslički niso skrili v zatočišče in tam ostali večji del trajanja poskusa. Še več, nekateri so se zatočišča celo izogibali. Takšno odstopanje je lahko posledica več dejavnikov, najverjetnejši med njimi pa je število osebkov, ki so bili testirani sočasno. Omenjena avtorja sta namreč izvedla skupinski poskus z osebki obeh spolov, naša raziskava pa je temeljila na vedenjskih odzivih posamičnih osebkov. Znano je, da skupine osebkov na okoljske dražljaje reagirajo drugače kot posamezni osebki (več o tem v poglavju 5.3). Odstopanje bi lahko povzročile tudi drugačne razmere ali časovni potek poskusa, saj je njuna raziskava potekala pri močnem osvetljevanju, natančen časovni potek poskusov pa ni podan.

Možna razlaga za naključno gibanje površinskih osličkov v naših individualnih poskusih izbire zatočišča je, da ob odsotnosti svetlobnega dražljaja in potencialnega plenilca niso imeli potrebe izbrati zatočišča. Enako ugodno so se očitno počutili na obeh polovicah petrijevke. Za vedenje tistih, ki so se zatočišča celo izogibali (populaciji Pivka v Planinski jami in Planinsko polje), smiselne razlage nismo uspeli najti. Ena od možnih bi bila, da je bilo z zatočiščem nekaj narobe. Ker je bilo postavljeno nad polovico petrijevke (ne premajhno) in sta bila dostop in stiskanje v režo pod njim možna ne glede na velikost živali,

bi pomanjkljivost glede dimenzij lahko izključili. Ker sta tudi Janzer in Ludwig (1952) za simulacijo zatočišča uporabila steklena prosojna objektna stekla, pod katera so se njihovi vodni oslički hitro stisnili, je neustreznost materiala (umeten izvor), iz katerega smo izdelali zatočišče malo verjetna. Malo verjetna je tudi razlaga, da so se nekateri osebki v naših poskusih izogibali zatočišču zaradi izluževanja ftalatov iz plastičnega zatočišča, saj smo vodo pred vsakim poskusom zamenjali, čas trajanja poskusov pa je bil prekratek za tovrsten učinek ftalatov na vedenje osličkov.

V nasprotju s pričakovanji smo (mejno) statistično razliko ( $p = 0,051$ ) med spoloma uspeli dokazati izključno pri populaciji s Planinskega polja. Sicer naj bi za površinske vodne osličke veljalo, da samci prej zapustijo zatočišče in naj bi bili "pogumnejši" od samic (Harris in sod., 2011). Tudi Lasnik (2012) je pri podzemeljskih vodnih osličkih iz Planinske jame ugotovila, da na sotočju obeh podzemeljskih rek le samci iz obeh populacij prehajajo na območje sosednje populacije.

Še posebej zanimivo je bilo opažanje, da so osebki istega ekomorfa iz različnih populacij izbrali različni polovici petrijevke (z in brez zatočišča), kar pomeni, da sta si bili glede na vedenje bolj podobni površinska in podzemeljska populacija iz para (Pivka – Planinsko polje, Rak – Cerknjsko polje) kot pa podzemeljski oz. površinski populaciji medsebojno. Ker je populacija s Planinskega polja filogenetsko bližje populaciji iz Pivke v Planinski jami, populacija s Cerknjskega polja pa populaciji iz Raka v Planinski jami (Verovnik in sod., 2003, 2004), bi to lahko razložili kot posledico sorodnosti in šibke selekcije za opazovano vedenje v podzemlju. Pri tem je bila variabilnost vedenja med osebki v vseh populacijah zelo velika.

Ker je bilo pri poskusu hrapavo celotno dno petrijevke, se večina osebkov ni vedla tako kot pri poskusu izbire hrapave podlage, kjer na gladki polovici petrijevke normalna hoja ni bila možna. Nismo torej mogli preveriti, ali je za vodne osličke iskanje oprijema bolj ali manj pomembno od iskanja zatočišča. To bi lahko ugotovili le, če bi bilo pod zatočiščem gladko dno. Glede na rezultate naših poskusov razlikam v izbiri zatočišča ne moremo pripisati delnega ali celo ključnega prispevka k celokupni reproduktivni izolaciji površinskih in podzemeljskih vodnih osličkov.

### 5.3 SKUPINSKA IZBIRA ZATOČIŠČA PRI VODNEM OSLIČKU

Pri skupinskih poskusih se je iskanje in skrivanje v zatočišču pri površinskih vodnih osličkih izkazalo za pomembnega. Žal smo izvedli le preliminarne poskuse, saj smo imeli na voljo premalo število osebkov, da bi z večkratnimi ponovitvami omogočili izvedbo statističnih analiz in potrditev hipoteze o pomenu skrivanja v zatočišču.

V poskusih s kopenskimi raki enakonožci (t. i. prašički) so združevanje v skupine (t. i. agregacijo) in mirovanje v zatočiščih opazili že v 45 min (Devigne in sod., 2011). Tudi Janzer in Ludwig (1952) sta poročala o zbiranju večine površinskih vodnih osličkov v zatočišču že po 30 min. V nasprotju z njunimi opažanji se oslički v naši raziskavi še po nekaj urah niso ustalili niti na hrapavi podlagi niti v zatočišču, zato smo stanje preverili po enem dnevu. Šele takrat se je z ustalivitvijo v zatočišču pokazala preferenca do zatočišča pri površinskih samcih in samicah. Ker smo (kot omenjena avtorja) za zatočišča uporabili steklena objektna stekla, časovnih razlik ne pripisujemo značilnostim zatočišča. Možni razlogi za opažene časovne razlike bi bili drugačna spolna struktura živali v poskusu (pri njiju mešana skupina osličkov, pri nas ločeni samci in samice) in različna čas ter način privajanja na poskusno okolje. Žal natančnih podatkov o slednjem avtorja ne podajata.

Pri izbiri zatočišča smo opazili zanimiv pojav večjega združevanja osebkov pod eno od dveh ponujenih zatočišč, kar je pokazatelj pomembnosti stika z drugimi osebki v zatočišču. Osebki so se torej zadržali v tistem zatočišču, v katerem so naleteli na drug osebek. Kljub temu, da so imeli pod zatočišči dovolj prostora za medsebojen razmik, so bili pod njimi navadno stisnjeni tesno skupaj. Podobno agregacijo so opazovali tudi pri pozidnem prašičku (*Oniscus asellus*) in navadnem prašičku (*Porcellio scaber*) (Friedlander, 1965; Devigne in sod., 2011; Broly in Deneubourg, 2015). Povezali so jo tako s kemičnimi kot fizikalnimi dražljaji, glavna razloga zanjo pa naj bi bila močna pozitivna tigmotaksija in higrokineza. Tesno združeni osebki namreč zadržijo več vlage kot posamezni, kar je za te kopenske rake življenjskega pomena. Pri vodnih osličkih higrokineza ne more biti razlog za združevanje, močno pozitivno tigmotaksijo (iskanje tesnega stika s celotnim telesom v zatočišču) pa smo z individualnimi poskusi izključili, zato bi iskanje razlag za ta pojav zahtevalo izvedbo nadaljnjih raziskav.

Ker se površinski vodni oslički na hrapavi podlagi niso združevali v tesne skupine in je do agregacije prišlo le v zatočišču na gladki podlagi, sklepamo, da za skupino vodnih osličkov hrapava podlaga ni pomembnejša od zatočišča. Nasprotje z rezultati individualnih poskusov nakazuje različno vedenje skupine in posamičnih vodnih osličkov. Trden sklep o tem na osnovi naših individualnih poskusov ni možen, saj se je čas opazovanja pri individualnih in skupinskih poskusih bistveno razlikoval. Ker pa smo v preliminarnih poskusih enkrat izbrali zatočišča pri dvajsetih posamičnih osebkih beležili cel dan, rezultati pa so se skladali s tistimi po dveh urah opazovanja, je naš sklep najverjetneje pravilen. To se sklada tudi z opažanji raziskave vodnih osličkov, ki so jo opravili Augusiak in sod. (2015). Opazili so namreč povečanje aktivnosti posamičnih vodnih osličkov v primerjavi s skupinami, kar so razlagali kot posledico iskanja drugih osebkov in zaščite pred plenilci. Podobne raziskave vedenja posamičnih osebkov in skupin so izvedli tudi s kopenskimi raki enakonožci (Broly in sod., 2014). Ugotovili so sicer, da osebki zaradi težnje po stiku z drugimi pripadniki vrste ti lahko izberejo tudi suboptimalne pogoje, a zaradi drugačne zasnove poskusa in uporabe kopenskih modelnih živali njihovi rezultati niso primerljivi z našimi.

Kljub le enkratni izvedbi skupinskega poskusa s podzemeljskimi (Rak v Planinski jami) in površinskimi (Cerkniško polje) vodnimi oslički, v njem vidimo možnost za nadaljnje raziskave in morebitno pojasnitev reproduktivne bariere. Lahko smo namreč opazovali pričakovan vedenjski vzorec izbire habitata, v katerem so se površinski osebkovi v večji meri (ca. 75% osebkov) zbirali v zatočišču kot podzemeljski (ca. 50% osebkov). Tovrstna razlika bi lahko prispevala k reproduktivni izolaciji, saj bi različna izbira habitata zmanjšala možnost medsebojnega srečanja in parjenja obeh ekomorfov.

Za sklepe o razlikah ter boljše razumevanje vloge vedenja v ekološki speciaciji bi morali skupinske poskuse večkrat ponoviti. Pri tem bi se morali soočiti z naravovarstveno problematičnim zagotavljanjem zadostnega števila poskusnih živali. Še posebej to velja za podzemeljske vodne osličke, saj so v Sloveniji zavarovani vsi jamski habitati, vključno s tam živečimi vrstami (Zakon o varstvu podzemnih jam, 2004).

#### 5.4 TEŽAVE IN POMANJKLJIVOSTI IZVEDENIH RAZISKAV

Augusiak in sod. (2015) so omenili le nekatere težave pri izvedbi vedenjskih poskusov z vodnimi nevretenčarji, kot sta npr. lom in odboj svetlobe na vodni gladini, zaradi česar sta postavitev vira svetlobe in snemalne naprave zahtevna. V izogib težavam so sicer predlagali označevanje živali in uporabo UV svetlobe, kar naj bi omogočilo lažje sledenje gibanju živali in poznejšo računalniško obdelavo posnetkov, vendar so s poskusi ugotovili, da oznake lahko spremenijo vedenje vodnih nevretenčarjev, zato se za to metodo nismo odločili. Da smo se izognili odbleskom in lomu svetlobe ter enakomerno osvetlili več petrijevk naenkrat, smo morali poskrbeti za homogeno rdečo osvetlitev pod petrijevkami. Pri tem je bilo pomembno, da osvetlitev ni bila premočna, ker bi lahko povzročila nezaželeno segrevanje vode v petrijevkah in presvetljenost posnetkov. Prešibka osvetlitev po drugi strani ne bi zagotovila dovolj kvalitetnih posnetkov za video analizo.

Ker smo poskušali simulirati jamsko, torej popolnoma temno okolje, bi morali načeloma za snemanje uporabiti toplotno IR kamero. Ker majhni vodni oslički v vodnem mediju ne oddajajo dovolj toplote, zmogljive IR kamere pa so zelo drage, smo bili za snemanje primorani uporabiti osvetlitev. Odločili smo se za šibko rdečo svetlobo, saj se površinski in podzemeljski vodni oslički ne odzivajo nanjo (Novak, 2014; Fišer Ž., ustno). Še boljše pogoje bi lahko omogočili, če bi osvetljevali z IR svetlobo (npr. 950 nm), ki je gotovo izven zaznavnega območja fotoreceptorskih pigmentov.

Za težavno se je izkazala tudi zahteva, da v petrijevko nismo smeli položiti neprozornih objektov, na katerih vodni oslički ne bi bili vidni; beleženje njihove aktivnosti v tem primeru ne bi bilo možno. Kljub prozornim zatočiščem se za računalniško video sledenje gibanju nismo odločili. Po poskusu računalniške analize smo namreč ugotovili, da bi delni odblesk

in lom svetlobe iz roba in sten petrijevke ter zatočišča vseeno močno upočasnili in otežili analizo prehojene poti s pomočjo računalniških programov. Žal smo s tem izgubili možnost preverjanja gibalne aktivnosti vodnih osličkov na osnovi prehojene poti.

Našo raziskavo vedenja vodnih osličkov smo želeli zasnovati čim preprosteje in omogočiti preverjanje vedenjskega odziva osebkov na le en dražljaj. S tem smo osebkke seveda prikrajšali za vse ostale dražljaje, ki v naravnem okolju sinergistično vplivajo na njihovo vedenje in preživetje (Peeters in sod., 2002). Opazovanje odziva na zatočišče smo v predhodnih poskusih izvedli v petrijevkah z gladko podlago, da bi izključili vpliv hrapave podlage. Izkazalo se je, da nam izbire zatočišča na gladki podlagi sploh ni uspelo preveriti. Za vodne osličke je bilo najpomembnejše iskanje oprijema, zato so se oprijeli tudi stika zatočišča s petrijevko, njegovega stranskega roba ali celo majhne raze na dnu petrijevke, ki jim je nudila oprijem. To vedenje je bilo še posebej izrazito pri podzemeljskih osebkih. Material, dimenzija in položaj zatočišča so se izkazali za velik izziv in zahtevali precej predhodnih preizkusov ustreznosti.

Pri preliminarnem skupinskem poskusu, v katerem osebkov nismo ločili po spolu, smo takoj opazili tvorbo prekopul med samci in samicami, kar je vplivalo na vedenjski poskus izbire zatočišča. Ob izvedbi skupinskih vedenjskih poskusov pri rakah, ki tvorijo prekopulo, je torej zelo pomembno tudi obdobje izvedbe poskusa. Pri skupinah, ločenih po spolu, smo predvsem med samci opazili agresivno vedenje, ki se je končalo s poginom nekaterih osebkov. S temi so se preostali vodni oslički hranili, kar je bistveno vplivalo na rezultat vedenjskega poskusa. Podobna opažanja so pri vodnih osličkih zabeležili tudi Peeters in sod. (2002).

Pri vedenjskih poskusih je zaradi kompleksnosti organizmov in tehničnih omejitev veliko težav, kar otežuje preverjanje navidezno preprostih predvidevanj oziroma zagotavljanje ustreznosti poskusa za postavljanje neizpodbitnih sklepov. Dejstvo je, da so tudi opisi spodletelih pripravljanih poskusov in opozorila na napake dragoceni za vse, ki se ukvarjajo s podobnimi raziskavami.

## 6 SKLEPI

Rezultate naše raziskave vedenja vodnih osličkov (*Asellus aquaticus*) lahko strnemo v naslednje ugotovitve:

- Tako pri površinskih kot podzemeljskih samcih in samicah smo pri individualnih poskusih dokazali izbiro hrapave napram gladki podlagi. Za oba ekomorfa vodnih osličkov je taka podlaga nujna za normalno gibanje in s tem tudi za izvedbo vedenjskih poskusov.
- Izbira hrapave podlage je bila izrazitejša pri podzemeljskih vodnih osličkih, ki so se na njej zadrževali statistično značilno dlje od površinskih. Večja potreba po oprijemu podlage predvidoma odraža večji selekcijski pritisk za obstanek živali v podzemlju ob prisotnem močnem vodnem toku.
- Pri izbiri zatočišča statistično značilnih razlik med površinskimi in podzemeljskimi samci in samicami v individualnih poskusih ni bilo. Predvidenega skrivanja površinskih osebkov v zatočišču na račun močnejše selekcije za skrivanje nismo potrdili.
- Z ugotovljenimi individualnimi vedenjskimi razlikami med površinskimi in podzemeljskimi vodnimi oslički žal ne moremo zadovoljivo pojasniti pojava reproduktivne izolacije med njimi. Potrebne bi bile nadaljnje raziskave.
- V preliminarnih skupinskih poskusih se je po enem dnevu večina površinskih samcev in samic v tesnih skupinah ustalila v zatočišču na gladki podlagi, tudi v primeru, ko so imeli na voljo hrapavo podlago. Razlike med individualnimi in skupinskimi poskusi pri tem nakazujejo bistven vpliv števila osebkov na vedenje vodnih osličkov.
- Pri skupini podzemeljskih osebkov se je v zatočišču ustalila manj kot polovica osebkov, ostali so izbrali hrapavo podlago. Razlike v izbiri podlage pri skupinah bi lahko pojasnile pojav reproduktivne bariere med površinskimi in podzemeljskimi vodnimi oslički. Potrebne bi bile nadaljnje skupinske vedenjske raziskave, ob upoštevanju naših ugotovitev in priporočil.
- Vodni osliček je s svojimi površinskimi in podzemeljskimi populacijami primerna vrsta za opazovanje vedenjskih prilagoditev na različna življenjska okolja in raziskave ekološke speciacije.

## 7 POVZETEK

Ekološka speciacija je proces, pri katerem divergentna naravna selekcija zaradi razlik v okolju privede do reproduktivne izolacije med populacijami ali subpopulacijami. Iskanje mehanizmov te speciacije ostaja izziv za empirične raziskave v evolucijski biologiji. Izrazite razlike med površjem in podzemljem so odlična osnova za študij ekološke speciacije. Pri tem so neprecenljivi modelni organizmi jamske živali, z morfološkimi prilagoditvami na jamsko okolje (troglomorfozami) in še živečimi površinskimi predniki. Kot modelni jamski nevretenčar se je uveljavil tudi vodni osliček, *Asellus aquaticus*, rak enakonožec, ki poseljuje mnoge tipe površinskih in podzemeljskih sladkovodnih habitatov po skoraj celotni Evropi. Primeren modelni organizem je zaradi večkratnih neodvisnih vselitev v podzemlje na majhnem geografskem območju, obstoja površinskih predniških populacij, dobrega poznavanja filogenetske zgodovine vrste, kratkega življenjskega cikla ter uspešnega parjenja med površinskimi in podzemeljskimi osebki v laboratoriju. Čeprav med podzemeljskimi in predniškimi površinskimi populacijami ni fizičnih pregrad in zato lahko prihajajo v medsebojni stik, z molekulskimi raziskavami med njimi niso dokazali genskega pretoka ali pa je bil ta zanemarljiv. Eden od možnih razlogov za reproduktivno izolacijo bi lahko bila razlika v izbiri habitata.

Izbira habitata je nabor hierarhično urejenih vedenj, pri čemer se osebek v enem tipu habitata nahaja dlje (tj. od pričakovanega ob naključnem gibanju) kot v drugem. Osebkou omogoča prepoznavo optimalnega okolja in preprečuje disperzijo v suboptimalno, s čimer se poveča njegov fitnes. Izbira različnega habitata lahko privede do habitatne izolacije, pri čemer nezmožnost ene populacije, da živi v okolju druge, bistveno omeji njun medsebojni reproduktivni stik v času razmnoževanja in posledično zmanjša ali onemogoči njuno križanje. Skrivanje v zatočišču za vodne nevretenčarje pomeni manjšo verjetnost uplenjenja in odplavljenja, vendar manj priložnosti za hranjenje in razmnoževanje. Tudi boljši oprijem podlage za nevretenčarje, ki hodijo po dnu, pomeni prednost. Namen naše raziskave je bil preveriti, ali med površinskimi in podzemeljskimi vodnimi oslički obstajajo bistvene razlike v preferenci bodisi do zatočišča bodisi do hrapave podlage, s čimer bi lahko pojasnili reproduktivno izolacijo med njimi.

Analizirali smo vedenje vodnih osličkov iz dveh površinskih populacij (s Planinskega in s Cerknškega polja) ter dveh podzemeljskih populacij (iz rek Pivka in Rak v Planinski jami). Iz vsake populacije smo izbrali po 20 nepoškodovanih odraslih samic in samcev. Aklimirali smo jih v jamskem laboratoriju v temi pri 10 °C. Izvedli smo dva tipa individualnih (tj. s posamičnimi osebki) vedenjskih poskusov: (i) izbiro hrapave podlage v petrijevkah, ki smo jim polovico dna zbrusili, da so imeli oslički na njej dober oprijem in (ii) skrivanje v zatočišču v petrijevkah z zbrušnim celotnim dnom, v katerih je polovico petrijevke pokrivalo prozorno zatočišče, ki je vodnim osličkom omogočilo stiskanje podenj.



Pri obeh tipih individualnih poskusov smo petrijevke postavili na rdečo svetlobno podlago in snemali vedenje vodnih osličkov s spletno kamero. Sočasno smo snemali po 20 petrijevk, v katere smo razporedili vodne osličke, ločene po spolu in populaciji. S posnetkov smo zabeležili čase vseh prehodov osebkov iz ene na drugo polovico petrijevke in za vsak osebek izračunali skupni čas zadrževanja na posamezni polovici.

Podatke smo statistično obdelali v programu R 3.2.4. Iz nadaljnje analize smo izločili osamelce z odmiki, večjimi od trikratnega interkvartilnega razmika. Podatke smo primerjali po spolu, populaciji in ekomorfu. Normalnost porazdelitve podatkov smo preverili s Shapiro-Wilkovim testom. Pri normalni porazdelitvi smo izračunali aritmetično sredino in standardno deviacijo ter uporabili Studentov t-test, Bartlettov test in izvedli dvosmerno analizo variance. Za preostale podatke smo izračunali mediano in interkvartilni rang ter uporabili Wilcoxonov test vsote rangov, Kruskal-Wallisov H test in Fligner-Killeenov test. Od podatkov o aktivnosti vodnih osličkov smo uporabili le podatke o času gibanja osebkov po hrapavi podlagi.

V preliminarnih poskusih s skupinami vodnih osličkov smo uporabili kvadratne steklene akvarije. Pri prvem tipu poskusa smo v akvarije na gladko dno postavili dve zatočišči iz objektnih stekelc, pri drugem tipu poskusa pa smo polovico dna prelepili s hrapavo folijo, na polovico z gladkim dnom pa postavili dve zatočišči iz objektnih stekelc. Tudi ti poskusi so potekali v jamskem laboratoriju, površinske osebkve smo opazovali pri beli svetlobi, podzemeljske pa v temi s pomočjo šibke rdeče naglavne svetilke. Sočasno smo opazovali po 20 samcev v enem in 20 samic v drugem akvariju. Število osebkov v različnih delih akvarija po preteku 24 ur smo analizirali le grafično, ker za statistično analizo nismo izvedli dovolj ponovitev poskusov.

Pri individualnih poskusih smo med površinskimi in podzemeljskimi vodnimi oslički opazili vedenjske razlike predvsem v izbiri tipa podlage. Nedvoumna izbira hrapave podlage pri samcih in samicah obeh ekomorfov je potrdila njen velik pomen zanje. To povezujemo z življenjem v tekočih vodah, kjer oprijem podlage zmanjšuje možnost odplavljanja živali. Izbira je bila opazno izrazitejša pri podzemeljskih osebkih, kar lahko pojasnimo z močnejšim selekcijskim pritiskom vodnega toka v podzemlju. Dolgotrajnejše zadrževanje na hrapavi podlagi ni bilo posledica manjše gibalne aktivnosti podzemeljskih osličkov. Kljub razlikam temu vedenju ne pripisujemo prispevka k celokupni reproduktivni izolaciji med obema ekomorfoma.

V nasprotju s predvidevanji se površinski vodni oslički niso skrili v zatočišče, nekateri so se ga celo izogibali. Možna razlaga za njihovo naključno gibanje je odsotnost svetlobe in potencialnega plenilca, razlage za izogibanje pa nimamo. Domneve o nastanku reproduktivne bariere zaradi razlik v izbiri zatočišča med površinskimi in podzemeljskimi vodnimi oslički nismo potrdili.

Za razliko od individualnih poskusov, so se pri preliminarnih skupinskih poskusih površinski vodni oslički ustalili v zatočišču, a šele po enem dnevu. Pri tem smo opazili zanimiv pojav večjega združevanja osebkov pod enim od dveh ponujenih zatočišč (agregacijo), kar kaže na pomembnost stika z drugimi osebki v zatočišču. Opazili smo tudi razliko med številom površinskih in podzemeljskih osebkov v zatočišču. Ta nakazuje pravilnost našega osnovnega predvidevanja o prispevku vedenjskih prilagoditev k nastanku reproduktivne bariere med ekomorfoma. Za potrditev bi bile potrebne nadaljnje individualne in skupinske vedenjske raziskave vodnih osličkov ob upoštevanju naših ugotovitev in priporočil.

## 8 VIRI

- Argano R. 1979. Isopodi (Crustacea Isopoda). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne Italiane, 5: 1-65
- Augusiak J., Van den Brink P. J. 2015. Studying the movement behavior of benthic macroinvertebrates with automated video tracking. *Ecology and Evolution*, 5, 8: 1563-1575
- Barnes J. B., Vaughan I. P., Ormerod S. J. 2013. Reappraising the effects of habitat structure on river macroinvertebrates. *Freshwater Biology*, 58: 2154-2167
- Becerra-Muñoz S., Schramm H. L. 2007. On the influence of substrate morphology and surface area on phytofauna. *Hydrobiologia*, 575: 117-128
- Baldwin E., Beatty R. A. 1941. The pigmentation of cavernicolous animals. *Journal of Experimental Biology*, 18: 136-143
- Birštein J. A. 1951. Presovodnye osliki (Asellota). V: Fauna SSSR: Rakoobraznye. Pavlovskii E. N., Štakelyberg A. A. (ur.). Moskva, Akademii Nauk SSSR: 144-165
- Block W. M., Brennan L. A. 1993. The habitat concept in ornithology: Theory and applications. *Current Ornithology*, 11: 35-91
- Božič J., Abramson C. I. 2003. Following and attending - two distinct behavior patterns of honeybees in a position to collect the dance information. *Mellifera*, 3, 6: 48-55
- Broly P., Devigne L., Deneubourg J. L., Devigne C. 2014. Effects of group size on aggregation against desiccation in woodlice (Isopoda: Oniscidea). *Physiological Entomology*, 39: 165-171
- Broly P., Deneubourg J. L. 2015. Behavioural contagion explains group cohesion in a social Crustacean. *PLoS Computational Biology*, 11, 6: e1004290, doi: 10.1371/journal.pcbi.1004290: 18 str.
- Coyne J. A., Orr H. A. 2004. Speciation. Sunderland, Sinauer: 545 str.
- Cuffney T. F., Wallace J. B., Webster J. R. 1984. Pesticide manipulation of a headwater stream: Invertebrate responses and their significance for ecosystem processes. *Freshwater Invertebrate Biology*, 3: 153-171

- Culver D. C., Pipan T. 2009. *The Biology of Caves and Other Subterranean Habitats*. New York, Oxford University Press: 254 str.
- Denno R. F., McClure M. S., Ott J. R. 1995. Interspecific interactions in phytophagous insects: competition reexamined and resurrected. *Annual Review of Entomology*, 40: 297-331
- Devigne C., Broly P., Deneubourg J. L. 2011. Individual Preferences and Social Interactions Determine the Aggregation of Woodlice. *PLoS ONE*, 6, 2: e17389, doi: 10.1371/journal.pone.0017389: 12 str.
- Dobzhansky T. 1951. *Genetics and the origin of species*. 3<sup>rd</sup> ed. New York, Columbia University Press: 364 str.
- Doligez B., Boulinier T. 2008. Habitat Selection and Habitat Suitability Preferences. V: *Encyclopedia of Ecology*. Jørgensen S. E., Fath B. D. (eds.). Oxford, Elsevier Academic Press: 1810-1830
- Englund G., Hambäck P. A. 2004. Scale-dependence of movement rates in stream invertebrates. *Oikos*, 105: 31-40
- Eroukhmanoff F., Hargeby A., Svensson E. I. 2011. The role of different reproductive barriers during phenotypic divergence of isopod ecotypes. *Evolution*, 65, 9: 2631-2640
- Findlay S., Meyer J. L., Smith P. J. 1986. Contribution of fungal biomass to the diet of a freshwater isopod (*Lirceus sp.*). *Freshwater Biology*, 16: 377-385
- Field A., Miles J., Field Z. 2013. *Discovering statistics using R*. London, Sage Publications: 992 str.
- Fingerut J. T., Fonseca D. M., Thomson J. R., Hart D. D. 2015. Seeking shelter from the storm: responses of benthic stream invertebrates to natural and experimental floods. *Freshwater Science*, 34, 3: 897-908
- Fišer C., Blejec A., Trontelj P. 2012. Niche-based mechanisms operating within extreme habitats: a case study of subterranean amphipod communities. *Biology Letters*, 8: 578-581
- Freilich J. E. 1989. A method for tagging individual benthic macroinvertebrates. *Journal of North American Benthological Society*, 8: 351-354

- Friedlander C. P. 1964. Thigmokinesis in woodlice. *Animal Behaviour*, 12, 1: 164-174
- Friedlander C. P. 1965. Aggregation in *Oniscus asellus* Linn. *Animal behaviour*, 13, 2: 342-346
- Friedrich M., Chen R., Daines B., Bao R., Caravas J., Rai P. K., Zgajmajster M., Peck S. B. 2011. Phototransduction and clock gene expression in the troglobiont beetle *Ptomaphagus hirtus* of Mammoth cave. *The Journal of Experimental Biology*, 214: 3532-3541
- Futuyma D. J. 2001. Ecological specialization and generalization. V: *Evolutionary Ecology*. Fox C. W., Roff D. A., Fairbairn D. J. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 177-189
- Gibert J., Deharveng L. 2002. Subterranean Ecosystems: A Truncated Functional Biodiversity. *BioScience*, 52, 6: 473-481
- Harris S., Eroukhmanoff F., Green K. K., Svensson E. I., Pettersson L. B. 2011. Changes in behavioural trait integration following rapid ecotype divergence in an aquatic isopod. *Journal of Evolutionary Biology*, 24, 9: 1887-1896
- Hendry A. P., Nosil P., Rieseberg L. H. 2007. The speed of ecological speciation. *Functional Ecology*, 21, 3: 455-464
- Henry J. P., Magniez G. 1983. Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales françaises, 4. Crustacés Isopodes (Principalement Asellotes). *Bulletin de la Société Linnéenne de Lyon*, 52: 319-367
- Henry J. P., Magniez G., Notenboom J. 1996. Isopoda Asellota de Turquie recoltés en 1987. *Contribution to Zoology*, 66, 1: 55-62
- Holomuzki J. R., Short T. M. 1988. Habitat use and fish avoidance behaviors by the stream-dwelling isopods *Lirceus fontinalis*. *Oikos*, 52: 79-86
- Holyoak M., Casagrandi R., Nathan R., Revilla E., Spiegel O. 2008. Trends and missing parts in the study of movement ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 19060-19065
- Howarth F. G. 1987. Evolutionary ecology of aeolian and subterranean habitats in Hawaii. *Current Biology*, 18: 295-396

- Hüppop K. 2012. Adaptation to low food. V: Encyclopedia of Caves. 2<sup>nd</sup> ed. White W. B., Culver D. C. (eds.). London, Elsevier Academic Press: 1-9
- Hutto R. L. 1985. Habitat selection by nonbreeding, migratory land birds. V: Habitat Selection in Birds. Cody M. L. (ed.). New York, Academic Press: 455-476
- Janzer W., Ludwig W. 1952. Versuche zur evolutorischen entstehung der hohlentirmerkmale. Zeitschrift für indukt. Abstammungs und Vererbungslehre, 84: 462-479
- Jones J. 2001. Habitat Selection Studies in Avian Ecology: A Critical Review. The Auk, 118, 2: 557-562
- Jones K. M. M., Boulding E. G. 1999. State-dependent habitat selection by an intertidal snail: the costs of selecting a physically stressful microhabitat. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 242: 149-177
- Juan C., Guzik M. T., Jaume D., Cooper S. J. B. 2010. Evolution in caves: Darwin's 'wrecks of ancient life' in the molecular era. Molecular Ecology, 19: 3865-3880
- Kelley J. L., Passow C. N., Plath M., Rodriguez L. A., Yee M. C., Tobler M. 2012. Genomic resources for a model in adaptation and speciation research: characterization of the *Poecilia mexicana* transcriptome. BMC genomics, 13: 652
- Klaus S., Mendoza J. C. E., Liew J. H., Plath M., Meier R., Yeo D. C. J. 2013. Rapid evolution of troglomorphic characters suggests selection rather than neutral mutation as a driver of eye reduction in cave crabs. Biology letters, 9, 2: 20121098
- Kley A., Kinzler W., Schank Y., Mayer G., Waloszek D., Maier G. 2009. Influence of substrate preference and complexity on co-existence of two non-native gammarideans (Crustacea: Amphipoda). Aquatic Ecology, 43: 1047-1059
- Konec M. 2015. Genetska diferenciacija in speciacija podzemeljskih in površinskih populacij vodnega oslička *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 146 str.
- Konec M., Prevorčnik S., Sarbu S. M., Verovnik R., Trontelj P. 2015. Parallels between two geographically and ecologically disparate cave invasions by the same species, *Asellus aquaticus* (Isopoda, Crustacea). Journal of Evolutionary Biology, 28, 4: 864-875

- Lagerspetz K. Y. H., Vainio L. A. 2006. Thermal behaviour of crustaceans. *Biological Reviews*, 81, 2: 237-258
- Langerhans R. B., Riesch R. 2013. Speciation by selection: a framework for understanding ecology's role in speciation. *Current Zoology*, 59: 31-52
- Lasnik K. 2012. Morfološka raznolikost jamskega vodnega oslička v Planinski jami. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 68 str.
- Long A., Ashe W., Ravana K., Simon K. S. 2011. The effects of water velocity and sediment size on *Acroneuria abnormis* (Plecoptera: Perlidae) entrainment. *Aquatic Insects*, 33, 2: 105-112
- Ludwig W. 1942. Zur evolutorischen Erklärung der Höhlentiermerkmale durch Allelelimination. *Biologisches Zentralblatt*, 62: 447-455
- Martin J.R. 2004. A portrait of locomotor behaviour in *Drosophila* determined by a video-tracking paradigm. *Behavioral Processes*, 67: 207-219
- Mayr E. 1942. *Systematics and the Origin of Species*. New York, Columbia University Press: 334 str.
- McKinnon J., Mori S., Blackman B. K., David L., Kingsley D. M., Jamieson L., Chou J., Schluter D. 2004. Evidence for ecology's role in speciation. *Nature*, 429, 6989: 294-298
- Moore J. 2002. *Parasites and the behavior of animals*. New York, Oxford University Press: 315 str.
- Morris D. W. 2003. Toward an ecological synthesis: a case for habitat selection. *Oecologia*, 136: 1-13
- Nathan R., Getz W. M., Revilla E., Holyoak M., Kadmon R., Saltz D. 2008. A movement ecology paradigm for unifying organismal movement research. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 19052-19059
- Novak L. 2014. Vpliv svetlobe na distribucijo podzemeljskih in površinskih postranic. Magistrska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 54 str.
- Pârvulescu L. 2009. The epigeal freshwater malacostracans (Crustacea: Malacostraca) of the rivers in the Anina Mountains (SW Romania). *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, seria Biologia*, 54: 3-17

- Peeters E. T. H. M., Camu J. M., Beijer J. A. J., Scheffer M., Gardeniers J. J. P. 2002. Response of the waterlouse *Asellus aquaticus* to multiple stressors: effects of current velocity and mineral substratum. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 9: 193-203
- Prevorčnik S., Blejec A., Sket S. 2004. Racial differentiation in *Asellus aquaticus* (L.) (Crustacea: Isopoda: Asellidae). *Archiv für Hydrobiologie*, 160: 193-214
- Protas M., Jeffery W. R. 2012. Evolution and development in cave animals: from fish to crustaceans. *WIREs Developmental Biology*, 1: 823-845
- Protas M., Trontelj P., Patel N. H. 2011. Genetic basis of eye and pigment loss in the cave crustacean, *Asellus aquaticus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 14: 5702-5707
- R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/> (9. 8. 2016)
- Rausher M. D. 1984. The evolution of habitat preference in subdivided populations. *Evolution*, 38, 3: 596-608
- Ravigné V., Dieckmann U., Olivieri I. 2009. Live where you thrive: Joint evolution of habitat choice and local adaptation facilitates specialization and promotes diversity. *The American Naturalist*, 174, 4: 141-169
- Rétaux S., Casane D. 2013. Evolution of eye development in the darkness of caves: adaptation, drift, or both? *EvoDevo*, 4, 1: 1-12
- Riesch R., Reznick D. N., Plath M., Schlupp I. 2016. Sex-specific local life-history adaptation in surface- and cave-dwelling Atlantic mollies (*Poecilia mexicana*). *Scientific reports*, 6: e22968, doi: 10.1038/srep22968: 13 str.
- Rivera M. A. J., Howarth F. G., Taiti S., Roderick G. K. 2002. Evolution in Hawaiian cave-adapted isopods Oniscidea: Philosciidae: vicariant speciation or adaptive shifts? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25: 1-9
- Robinson E. J. H., Richardson T. O., Sendova-Franks A. B., Feinerman O., Franks N. R. 2008. Radio tagging reveals the roles of corpulence, experience and social information in ant decision making. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63: 627-636
- Rundle H. D., Nosil P. 2005. Ecological speciation. *Ecology Letters*, 8: 336-352



- Schick R. S., Loarie S. R., Colchero F., Best B. D., Boustany A., Conde D. A. 2008. Understanding movement data and movement processes: current and emerging directions. *Ecology Letters*, 11: 1338-1350
- Schluter D. 2001. Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 7: 372-380
- Schluter D. 2009. Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science*, 323: 737-41
- Simon P., Dupuis R., Costentin J. 1994. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behavioural Brain Research*, 61: 59-64
- Sket B. 1994. Distribution of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae) and its hypogean populations at different geographic scales, with a note on *Proasellus istrianus*. *Hydrobiologia*, 287: 39-47
- Sket B. 2008. Can we agree on an ecological classification of subterranean animals? *Journal of Natural History*, 42, 22: 1549-1563
- Starry O., Wanzenböck J., Danielopol D. L. 1998. Tendency of the amphipod *Gammarus roeseli* Gervais to colonize coarse sediment habitats under fish predation pressure. *International Review of Hydrobiology*, 83, 5: 371-380
- Strecker U., Hausdorf B., Wilkens H. 2012. Parallel speciation in *Astyanax* cave fish Teleostei in Northern Mexico. *Molecular phylogenetics and evolution*, 62: 62-70
- Trontelj P. 2012. Natural Selection. V: *Encyclopedia of Caves*. 2<sup>nd</sup> ed. White W. B., Culver D. C. (eds.). London, Elsevier Academic Press: 543-549
- Trontelj P., Blejec A., Fišer C. 2012. Ecomorphological convergence of cave communities. *Evolution*, 66: 3852-3865
- Turk-Prevorčnik S., Blejec A. 1998. *Asellus aquaticus infernus*, New Subspecies (Isopoda: Asellota: Asellidae), from Romanian Hypogean Waters. *Journal of Crustacean Biology*, 18, 4: 763-773
- Verovnik R., Prevorčnik S., Jugovic J. 2009. Description of a neotype for *Asellus aquaticus* Linné, 1758 (Crustacea: Isopoda: Asellidae), with description of a new subterranean *Asellus* species from Europe. *Zoologischer Anzeiger*, 248: 101-118

- Verovnik R., Sket B., Prevorčnik S., Trontelj P. 2003. Random amplified polymorphic DNA diversity among surface and subterranean populations of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Genetica*, 119: 155-165
- Verovnik R., Sket B., Trontelj P. 2005. The colonization of Europe by the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) proceeded from ancient refugia and was directed by habitat connectivity. *Molecular Ecology*, 14: 4355-4369
- Webster S. E., Galindo J., Grahame J. W. and Butlin R. K. 2012. Habitat choice and speciation (Review). *International Journal of Ecology*, 2012: 1-12
- White W. B., Culver D. C. 2012. *Encyclopedia of Caves*. 2<sup>nd</sup> ed. London, Elsevier Academic Press: 945 str.
- Wickham H. 2009. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 1<sup>st</sup> ed. New York, Springer: 213 str.
- Wilhelm F. M., Taylor S. J., Adams G. L. 2006. Comparison of routine metabolic rates of the stygobite, *Gammarus acherondytes* (Amphipoda: Gammaridae) and the stygophile, *Gammarus troglophilus*. *Freshwater Biology*, 51: 1162-1174
- Williams W. D. 1962. The geographical distribution of the isopods *Asellus aquaticus* (L.) and *A. meridianus* Rac. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 139: 75-96
- Williams D. D., Moore K. A. 1982. The effect of environmental factors on the activity of *Gammarus pseudolimnaeus* (Amphipoda). *Hydrobiologia*, 96: 137-147
- Williams D. D., Mundie J. H. 1978. Substrate size selection by stream invertebrates and the influence of sand. *Limnology and Oceanography*, 23, 5: 1030-1033
- Zakon o varstvu podzemnih jam (ZVPJ). 2004. Ur.l. RS, št. 2/04
- Zhao X., Fox M. G., Lasenby D. C., Armit A. C., Kothawala D. N. 2007. Substrate selection and seasonal variation in abundance and size composition of isopod *Lirceus fontinalis* in Ontario streams, Canada. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 25, 2: 215-220
- Zidar P., Božič J., Štrus J. 2005. Behavioral response in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea) offered a choice of uncontaminated and cadmium-contaminated food. *Ecotoxicology*, 14, 5: 493-502

## ZAHVALA

Najprej bi se zahvalila svoji mentorici, brez katere bi bila v zadnjem letu mnogokrat izgubljena. Hvala za vse nasvete pri izvedbi poskusov in pisanju naloge in hvala za podporo pri prav vsakem koraku na poti od zasnove do zaključka raziskave.

Ogromna zahvala gre tudi Žigu - mojemu pomočniku, ki je poskrbel za rešitev prav vsake tehnične težave, pomagal pri statističnih zankah v katere sem se nešteto ujeta in bil zraven pri vsaki neskončni debati o tem, kaj oslički pravzaprav sploh počnejo.

Hvala tudi hišniku na Oddelku za biologijo, ki nama je z Žigom prijazno dovolil uporabo njegovega orodja in delavnice za izdelavo nekaterih elementov za izvedbo poskusov.

Hvala recenzentu za vse vsebinske popravke in ideje, hvala tudi predsedniku za še zadnje, a ključne popravke v nalogi.

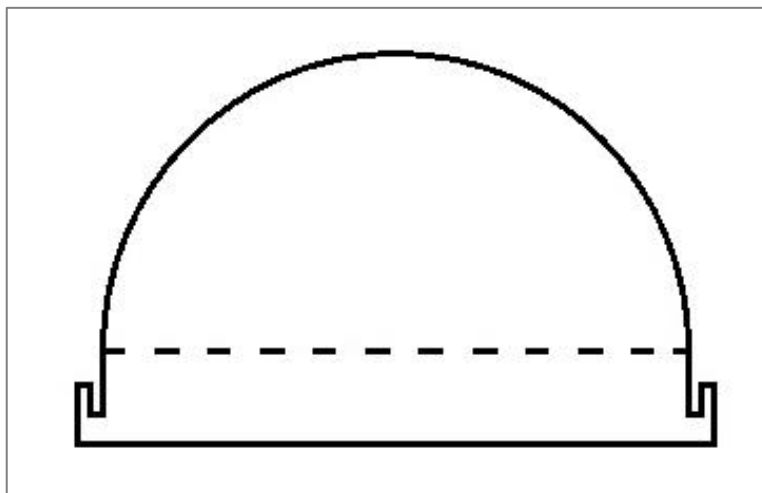
Hvala prijateljici Klasji za natančen pregled besedila in opozorila na slovnične napake, ki jih sama nikoli ne bi odkrila.

Hvala družini in vsem prijateljem, ki so mi v celotnem času študija stali ob strani in mi polepšali vsa pretekla študentska leta. Še posebej hvala sošolcem na 2. stopnji, s katerimi sem preživela veliko nepozabnih terenskih dni.

In nenazadnje, hvala vsem vodnim osličkom za bolj ali manj vzorno vedenje pred kamero.

## PRILOGA A

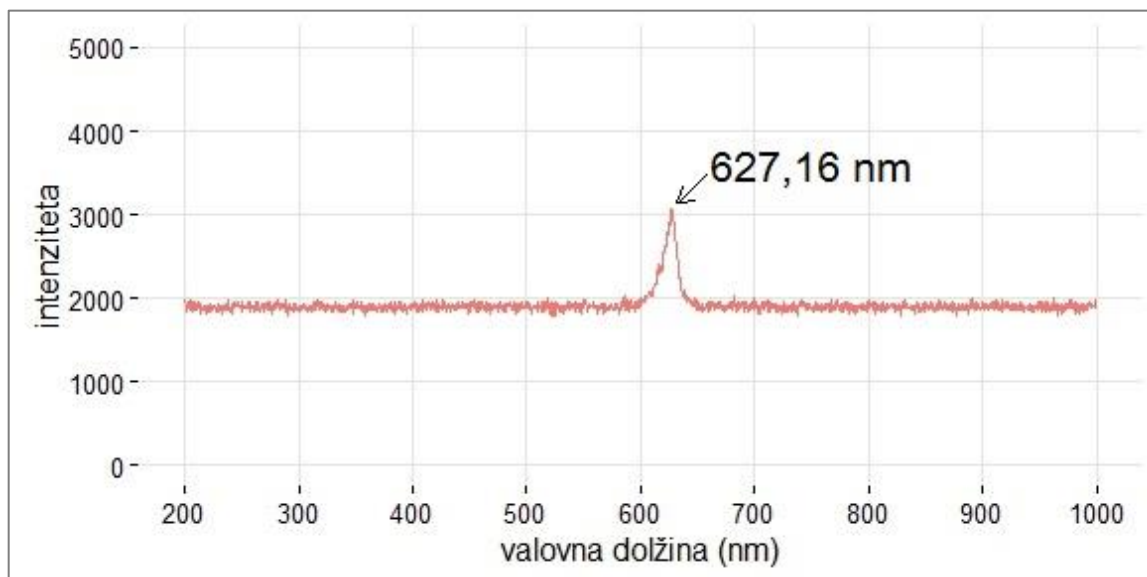
### Načrt za izdelavo zatočišča za individualne poskuse izbire zatočišča



Slika A1: Načrt za izdelavo zatočišča iz plastične plošče, ki smo ga namestili v petrijevko za individualne poskuse izbire zatočišča. Prekinjena črta prikazuje pregib za 90°.

## PRILOGA B

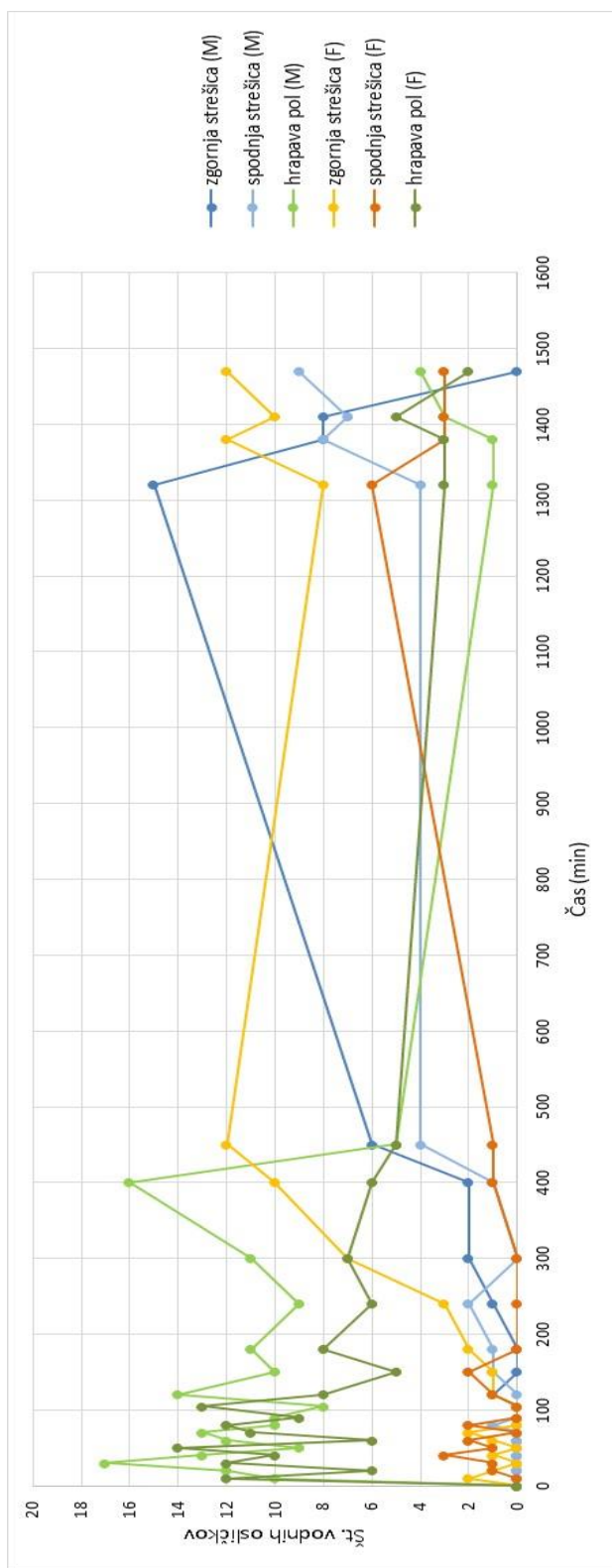
### Svetlobni spekter LED diod v podlagi za petrijevke, ki smo jo uporabljali pri individualnih poskusih z vodnimi oslički



Slika B1: Svetlobni spekter LED diod v podlagi za petrijevke. Izmerjeno z napravo Jaz spectrometer (Ocean Optics).

## PRILOGA C

### Primer časovnega poteka skupinskega poskusa z vodnimi oslički s Cerkniškega polja



Slika C1: Časovni potek števila vodnih osličkov s Cerkniškega polja na različnih delih akvarija s hrapavo in gladko polovico ter dvema zatočiščema na gladki polovici. V akvariju je bilo naenkrat po 20 samcev ali samic.