

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Zarja MURŠIČ

**EVOLUCIJA SVETLOBNEGA ODZIVA PRI JAMSKIH  
POPULACIJAH VODNEGA OSLIČKA (*Asellus aquaticus*)**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Zarja MURŠIČ

**EVOLUCIJA SVETLOBNEGA ODZIVA PRI JAMSKIH  
POPULACIJAH VODNEGA OSLIČKA (*Asellus aquaticus*)**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

**EVOLUTION OF RESPONSE TO LIGHT IN CAVE POPULATIONS  
OF THE FRESHWATER ISOPOD (*Asellus aquaticus*)**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je sklepni del magistrskega študijskega programa 2. stopnje, Strukturna in funkcionalna biologija, na Biotehniški fakulteti na Univerzi v Ljubljani. Terensko delo je potekalo na izbranih lokacijah v Sloveniji. Eksperimentalni in analitični del naloge sta bila opravljena na Katedri za zoologijo, Oddelku za biologijo na Biotehniški fakulteti.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za biologijo ter Senat Oddelka za biologijo sta dne 21. februarja 2014 za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Petra Trontlja ter za recenzenta doc. dr. Ceneta Fišerja. Za predsednika Komisije za oceno in zagovor magistrskega dela je bil imenovan doc. dr. Gregor Belušič.

Predsednik: doc. dr. Gregor BELUŠIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

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

Datum zagovora: 15. 11. 2016

Podpisana izjavljam, da je magistrska naloga 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 v Digitalni knjižnici Biotehniške fakultete.

Zarja Muršič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 595.3:591.5(043.2)=163.6
KG	ekološka speciacija/reproduktivna bariera/fotofobija/podzemeljska favna/ <i>Asellus aquaticus</i>
AV	MURŠIČ, Zarja, diplomirana biologinja (UN)
SA	TRONTELJ, Peter (mentor)/FIŠER, Cene (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije
LI	2016
IN	EVOLUCIJA SVETLOBNEGA ODZIVA PRI JAMSKIH POPULACIJAH VODNEGA OSLIČKA ( <i>Asellus aquaticus</i> )
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	VI, 42 str., 5 pregl., 7 sl., 1 pril., 93 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Podzemeljske živali imajo zaradi življenja v temi praviloma reducirane oči in pigment, a vendar se večina vrst odziva na svetlobo. Kljub temu še vedno ni jasno, kako se ob prilagajanju na podzemeljsko okolje spremeni vedenjski odziv na svetlobo. Vprašanje je tudi, če ta odziv morebiti deluje kot reproduktivna bariera med jamskimi in površinskimi vrstami. Primerjali smo odziv na svetlobo štirih jamskih in treh predniških površinskih populacij enakonožnega raka, vodnega oslička <i>Asellus aquaticus</i> . Vedenjski odziv posameznih osebkov smo izmerili v temi (kontrolni poskus) in pri petih jakostih svetlobe, v petrijevkah razdeljenih na osvetljeno in zatemnjeno polovico. Podatke smo statistično analizirali s posplošenimi linearnimi mešanimi modeli (GLMM). Vedenjski odziv vodnih osličkov iz Zelških jam in jame Škratovke je bil izrazito fotofoben. Nasprotno so se oslički iz Pivkinega rokava Planinske jame in Krške jame fotofobno odzvali šele pri najvišjih jakostih svetlobe, njihovo vedenje pa je bilo opazno bolj variabilno. Odziv površinskih populacij je bil podoben, zmerno fotofoben. Odziv vseh jamskih populacij se je razlikoval od odziva predniških površinskih populacij, a vendar ne na enak način. To priča o nekonvergentni evoluciji tega vedenja ob prilagajanju na podzemeljsko okolje. Vedenjski odziv na svetlobo lahko vsaj v nekaterih primerih deluje kot reproduktivna bariera in prispeva k speciaciji jamskih živali.

## KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2

DC UDC 595.3:591.5(043.2)=163.6

CX ecological speciation/reproductive barrier/photophobia/subterranean fauna/*Asellus aquaticus*

AU MURŠIČ, Zarja, dipl. biol. (UN)

AA TRONTELJ, Peter (supervisor)/FIŠER, Cene (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Master Study Programmes in Structural and Functional Biology

PY 2016

TI EVOLUTION OF RESPONSE TO LIGHT IN CAVE POPULATIONS OF THE FRESHWATER ISOPOD (*Asellus aquaticus*)

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programme)

NO VI, 42 p., 5 tab., 7 fig., 1 ann., 93 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Life in the dark has caused a reduction of eyes and pigmentation of subterranean animals, yet most of them retained the ability to sense and respond to light. It is still unclear, however, how behavioral response to light changes during adaptation of surface species to subterranean habitats and whether it might function as a reproductive barrier between surface and subterranean species. We compared the response to light of four cave and three ancestral surface populations of the freshwater isopod *Asellus aquaticus*. The behavioral response to light was observed in a Petri dish divided into an illuminated and a dark half. Each individual's behavior was measured in darkness (control) and at five different light intensities. Data were analysed using generalized linear mixed models (GLMM). The behavioral response of subterranean populations from the caves Zelške jame and Škratovka was strongly photophobic. Differently, subterranean populations from the Pivka River Channel of the Planina Cave and Krška jama avoided light only at higher light intensities; their response was also more variable. All three surface populations displayed a similar photophobic response. The response of all cave populations differed from their ancestral surface population, but the differences were not alike between distinct pairs. This points to non-convergent evolution of this behavior during adaptation to the subterranean environment. At least in some cases the behavioral response to light could also function as a reproductive barrier and contribute to the speciation of cave animals.

## 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>
1.1 SPECIACIJA.....	1
1.2 REPRODUKTIVNA IZOLACIJA.....	3
1.3 PRILAGODITVE ŽIVALI NA PODZEMLJE.....	4
1.4 REPRODUKTIVNA IZOLACIJA MED JAMSKIMI IN POVRŠINSKIMI ŽIVALMI .....	5
1.5 VEDENJSKI ODZIV NA SVETLOBO .....	6
1.6 VODNI OSLIČEK .....	8
1.7 HIPOTEZA RAZISKAVE.....	9
<b>2 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>11</b>
2.1 IZBOR POPULACIJ IN VZORČENJE.....	11
2.2 AKLIMACIJA.....	12
2.3 MERJENJE VEDENJSKEGA ODZIVA NA SVETLOBO .....	13
<b>2.3.1 Postavitev poskusa.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.2 Protokol meritev vedenjskega odziva na svetlobo.....</b>	<b>15</b>
2.4 ANALIZA PODATKOV .....	16
<b>3 REZULTATI.....</b>	<b>18</b>
<b>4 RAZPRAVA .....</b>	<b>27</b>
4.1 VEDENJSKI ODZIV NA SVETLOBO JAMSKIH IN POVRŠINSKIH POPULACIJ .....	27
4.2 VEDENJSKI ODZIV NA SVETLOBO KOT REPRODUKTIVNA BARIERA .....	28
4.3 EVOLUCIJA VEDENJSKEGA ODZIVA NA SVETLOBO PRI JAMSKIH ŽIVALIH.....	29
<b>5 SKLEPI.....</b>	<b>31</b>
<b>6 POVZETEK .....</b>	<b>33</b>
<b>7 VIRI.....</b>	<b>35</b>

**ZAHVALA**

**PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Seznam lokacij jamskih in predniških površinskih populacij vodnih osličkov, uporabljenih v raziskavi.....	11
Pregl. 2: Primerjava vedenjskega odziva v temi s pričakovano naključno izbiro osvetljene in zatemnjene polovice .....	19
Pregl. 3: Primerjava odziva pri posameznih jakostih svetlobe z naključno izbiro polovic petrijevke (»nič«) pri jamskih in površinskih populacijah vodnih osličkov.....	21
Pregl. 4: Primerjava odziva pri dveh zaporednih jakostih svetlobe.....	22
Pregl. 5: Primerjava vedenjskega odziva na svetlobo jamskih in pripadajočih predniških površinskih populacij pri isti jakosti svetlobe. ....	25



## KAZALO SLIK

Sl. 1: Površinski ekomorf in jamski ekomorf vodnega oslička .....	9
Sl. 2: Zemljevid lokacij jamskih in površinskih populacij vodnih osličkov .....	12
Sl. 3: Postavitev poskusa za merjenje vedenjskega odziva na svetlobo .....	15
Sl. 4: Vedenjski odziv v temi vseh jamskih in površinskih populacij vodnih osličkov.....	18
Sl. 5: Vedenjski odziv na svetlobo jamskih populacij vodnih osličkov .....	23
Sl. 6: Vedenjski odziv na svetlobo površinskih populacij vodnih osličkov .....	24
Sl. 7: Primerjava vedenjskega odziva na svetlobo jamskih in pripadajočih predniških površinskih populacij vodnih osličkov .....	26

## KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Vpliv tipa aklimacije na vedenjski odziv na svetlobo površinskih in jamskih vodnih osličkov *Asellus aquaticus*

## 1 UVOD

Izvor novih vrst že iz časa Darwina (1859) predstavlja eno izmed osrednjih vprašanj evolucijske biologije. Raziskovalci speciacije preučujejo nastanek različnih oblik reproduktivne izolacije, ki predstavlja temelj za nastanek novih vrst. Če je bilo v preteklosti glavno vprašanje, ali naravna selekcija lahko povzroči speciacijo, danes preučujemo, kako slednja vodi do nastanka novih vrst. Med najbolj preučevane načine sodi ekološka speciacija, pri kateri divergentna selekcija zaradi razlik v okoljskih dejavnikih povzroči nastanek bioloških barier genskemu pretoku med populacijami (Nosil, 2012). Zaradi velikih razlik v okoljskih dejavnikih med površjem in podzemljem slednja predstavljata odličen modelni sistem za raziskave ekološke speciacije. Okoljski dejavnik, ki v podzemlju domnevno predstavlja glavni selekcijski pritisk za tamkajšnje živali, je stalna tema (Pipan in Culver, 2012). Kako se ob prilagajanju na življenje v podzemlju spremeni vedenjski odziv na svetlobo, še ni povsem pojasnjeno. V veliki meri je neznana tudi narava reproduktivne izolacije med površinskimi in jamskimi vrstami. Za razreševanje podobnih vprašanj so najustreznejše vrste, kot je vodni osliček *Asellus aquaticus*, ki so večkrat neodvisno naselile podzemlje in imajo tudi še živeče predniške površinske populacije. V nadaljevanju naloge sledi kratek pregled tematik, pomembnih za razumevanje predstavljenega raziskovalnega problema.

### 1.1 SPECIACIJA

Speciacija je evolucijski proces nastajanja novih vrst. Bistvo tega procesa predstavlja evolucija reproduktivne izolacije med nastajajočima vrstama. Zato se večina raziskovalcev speciacije pri definiciji vrste opira na biološki koncept vrste (Mayr, 1942; 1995), po katerem je vrsta skupina naravnih populacij, katerih osebki se med seboj razmnožujejo in so reproduktivno ločeni (izolirani) od drugih takšnih skupin populacij.

Do nedavnega so raziskovalci v ospredje speciacije postavljali njene geografske okoliščine in jo delili na alopatrično, parapatrično in simpatrično (Mayr, 1963). Najbolj podprta razlaga izvora novih vrst je bila alopatrična speciacija. Po njej vrste nastanejo s prekinitvijo genskega pretoka zaradi geografske izolacije, ki jo povzročijo vikariantni dogodki, kot so na primer nastanek gorovja, otoka ali sprememba toka reke. Nastanek parapatrične speciacije, pri kateri se areala razhajajočih populacij delno prekrivata, in

simpatrične speciacije, kjer nastajajoči vrsti živita na istem območju, je bilo težje pojasniti (Coyne, 1992). Raziskovalci dolgo niso uspeli zadovoljivo razložiti in pokazati, kako lahko v teh okoliščinah pride do prekinitve genskega pretoka (Coyne in Orr, 1998).

V sodobnejši literaturi o procesu nastajanja novih vrst vse pogosteje postavljajo v ospredje mehanizme, ki vodijo do reproduktivne izolacije, geografskim okoliščinam pa namenljajo manj pozornosti (Schluter, 2001). Raziskovalci odkrivajo, da lahko nastanek novih vrst pogosto pripišemo delovanju naravne selekcije in se vse bolj posvečajo tako imenovani ekološki speciaciji (Rundle in Nosil, 2005). Ekološka speciacija je proces, pri katerem zaradi razlik v okoljskih dejavnikih divergentna selekcija povzroči nastanek bioloških barier genskemu pretoku med populacijami (Nosil, 2012).

Temelje ekološke speciacije torej predstavljajo razlike med ekološkimi dejavniki različnih okolij, ki so vir divergentne selekcije (Rundle in Nosil, 2005). Ekološki dejavniki so lahko abiotski (npr. pH, temperatura vode in zraka, svetlobne razmere, hitrost vodnega toka) ali biotski (npr. prisotnost plenilcev in kompetitorjev) (Schluter, 2009). Ob prilagajanju populacij na različna okolja se razvija tudi reproduktivna izolacija. Nastanek novih vrst pri ekološki speciaciji je torej stranski produkt prilagajanja na okoljske razlike (Nosil, 2012). Lastnosti, na katere deluje divergentna selekcija, lahko povzročijo reproduktivno izolacijo neposredno ali posredno. V prvem primeru so geni za lastnosti pod selekcijo in geni, odgovorni za reproduktivno izolacijo, eni in isti. Temu scenariju ustreza npr. selekcija za določeno telesno velikost, ki hkrati vpliva tudi na izbiro spolnega partnerja (Nagel in Schluter, 1998). V drugem primeru pa geni za lastnosti pod selekcijo in geni, ki povzročijo reproduktivno izolacijo, niso isti, pač pa se vezano dedujejo (angl. linkage disequilibrium) (Rundle in Nosil, 2005).

Modelne organizme za preučevanje ekološke speciacije predstavljajo na primer: Darwinovi ščinkavci (rodovi *Geospiza*, *Certhidea*, *Camarhynchus*, *Pinaroloxias* in *Platyspiza*) na Galapaških otokih (Grant in Grant, 1979; Grant in Grant, 2003; Tonnis in sod., 2005); riba navadni zet (*Gasterosteus aculeatus*) v ledeniških jezerih severozahodne obale Severne Amerike (Schluter in Rambaut, 1996; McKinnon in sod., 2004) in kuščarji iz rodu *Anolis* iz karibskih otokov (Thorpe in sod., 2010); med

nevretenčarji pa polžki iz rodu *Littorina* (Cruz in sod., 2004), paličnjaki iz rodu *Timena* (Nosil, 2007), metulji *Heliconius* (Jiggins, 2008) in vinske mušice *Drosophila* (Coyne in Orr, 1997; Smadja in Butlin, 2009).

Omenjeni organizmi so večkrat neodvisno naselili enake pare različnih okolij (paralelna speciacija), nekateri med njimi pa imajo tudi hiter življenjski cikel ter jih je enostavno vzdrževati in gojiti v laboratoriju, ob tem pa jih lahko tudi medsebojno križamo. Naštete lastnosti pomenijo, da so to dobri modelni organizmi za raziskave ekološke speciacije.

## 1.2 REPRODUKTIVNA IZOLACIJA

Reproduktivna izolacija je skupek mehanizmov (barier), ki osebkom različnih vrst preprečujejo tvorbo plodnih potomcev (Turelli in sod., 2001). V nekaterih primerih je za popolno prekinitev genskega pretoka dovolj že ena reproduktivna bariera, v drugih pa je reproduktivna izolacija sestavljena iz več barrier (Nosil, 2012). Posamezne reproduktivne bariere lahko uvrstimo v tri skupine: predparitvene, poparitvene predzigotne in pozigotne (Coyne in Orr, 2004).

Predparitvene bariere so tiste, ki osebkom preprečijo medsebojno parjenje. Mednje sodijo habitatna, časovna in vedenjska izolacija, neviabilnost imigrantov ter še nekatere druge oblike barrier (Rundle in Nosil, 2005). Do habitatne izolacije privede izbira različnih okolij, ki močno zmanjša medsebojni stik populacij in možnost navzkrižnega parjenja. Temu vedenju pravimo izbira habitata, nanj pa vplivajo tako abiotski kot biotski dejavniki okolja (Rundle in Boughman, 2010; Webster in sod., 2012). Če se osebki dveh populacij razmnožujejo ob različnem času, govorimo o časovni izolaciji (Wood in Keese, 2000). Vedenjska izolacija pa vključuje vedenjske lastnosti, zaradi katerih osebki za spolne partnerje pogosteje izbirajo osebke iz lastne populacije kot osebke iz drugih populacij (Boughman, 2001; Pickles in Grahame, 1999). Neviabilnost imigrantov deluje kot bariera, ker je preživetje osebkov v habitatu, na katerega niso prilagojeni, zmanjšano (Nosil in sod., 2005).

Poparitvene predzigotne bariere so tiste, pri katerih sicer pride do parjenja, ne pa tudi do združitve gamet (Nosil, 2012). Razloga za to sta lahko npr. neuspešen prenos gamet po reproduktivnem traktu ali pa nezmožnost zlitja v zigoto zaradi nekompatibilnih

biokemijskih mehanizmov. Takšne bariere poznamo pri mnogih morskih organizmih, kot na primer pri morskih zvezdah iz rodu *Asterias* (Harper in Hart, 2005).

Pozigotne bariere pa so tiste, ki preprečujejo genski pretok med populacijami kljub uspešni združitvi gamet njihovih osebkov (Rundle in Nosil, 2005). Vzrok je pogosto genetska nekompatibilnost gamet in posledičen neuspešen razvoj zarodka ali pa sterilnost potomca. Če pa je potomec normalno razvit in ploden, je njegov fitnes lahko majhen zaradi slabše prilagojenosti okolju in zmanjšane sposobnosti parjenja ob izraženih vmesnih lastnostih obeh staršev (Vamosi in Schluter, 2002).

Pri ekološki speciaciji delujejo tako predparitvene kot pozigotne bariere. Vendar zaradi neposredne vloge ekoloških dejavnikov okolja pri habitatni in časovni izolaciji ter neviabilnosti imigrantov in zmanjšanega fitnesa križancev zaradi neprilagojenosti okolju najpogosteje pričakujemo prav slednje oblike reproduktivnih barier.

### 1.3 PRILAGODITVE ŽIVALI NA PODZEMLJE

Podzemlje in jamske živali so odličen modelni sistem za ekološke in evolucijske raziskave, vedno pogosteje pa tudi za raziskave ekološke speciacije. Podzemeljsko okolje z jamami lahko razumemo kot nekakšne otoke na kopnem (Culver in sod., 1995) in ob tem tudi kot naravne laboratorije (Poulson in White, 1969) za tovrstne raziskave. Odlikujeta jih jasna ekološka ločnica od površinskega okolja pa tudi nižja kompleksnost, zaradi katere je večinoma lažje prepoznati posamezne selekcijske pritiske, ki so pogosto močni in zelo drugačni kot na površju (Culver in Pipan, 2009).

Podzemeljsko okolje se od površinskega močno razlikuje tako v abiotskih kot tudi biotskih dejavnikih. Ti so vzrok divergentne selekcije, ki povzroča ekološko speciacijo. Za podzemlje najznačilnejši abiotski dejavnik je gotovo stalna tema, pomembna pa so tudi majhna nihanja dejavnikov, kot so temperatura vode in zraka ter vlaga. Med značilne biotske dejavnike sodijo odsotnost fotoavtotrofov (tj. primarnih producentov), omejen dotok alohtonih organskih snovi in odsotnost ali manjša prisotnost plenilcev ter kompetitorjev (Culver in Pipan, 2009).

Na okoljske razmere v podzemlju so se jamske živali prilagodile s specifičnimi prilagoditvami, ki so zaradi podobnosti različnih podzemeljskih okolij pogosto konvergentne. Konvergentne evolucijske prilagoditve morfologije pri podzemeljskih živalih imenujemo troglomorfoze (Christiansen, 1962) in so jih do danes že veliko raziskovali. Med najznačilnejše troglomorfoze sodijo izguba ali delna redukcija oči in pigmenta ter podaljšanje okončin (Culver in Pipan, 2009). Slabše raziskane so fiziološke in vedenjske prilagoditve jamskih živali. Med prvimi se pogosto omenjajo upočasnen metabolizem (Mösslacher in Creuze des Charelliers, 1996; Spicer, 1998), manjša poraba kisika (Simčič in Brancelj, 2007) in podobne prilagoditve na majhno količino hrane v podzemlju (Culver in Pipan, 2009). Med proučevana vedenja pa sodijo na primer odziv na svetlobo (Langecker, 1992), iskanje hrane in aktivno gibanje (Mösslacher in Creuze des Charelliers, 1996; Manenti in sod., 2013), agresivno vedenje (Parzefall, 2012; Burchards in sod., 1985) ter paritveno vedenje (Plath in sod., 2005).

Ekologijo in evolucijo jamskih živali so najintenzivneje raziskovali pri jamskih ribah *Astyanax mexicanus* (Protas in Jefferey, 2012) in *Poecillia mexicana* (Kelley in sod., 2012) ter pri nekaterih jamskih nevretenčarjih, predvsem slepih postranicah iz rodu *Niphargus* (Trontelj in sod., 2012) in pri severnoameriški postranici *Gammarus minus* (Culver in sod., 1995), enakonožcu *Asellus aquaticus* (Protas in sod., 2011) ter avstralskih vodnih hroščih iz družine kozakov (Dytiscidae) (Cooper in sod., 2002). Po raziskavah ekološke speciacije pa prednjači riba *Poecillia mexicana*.

#### 1.4 REPRODUKTIVNA IZOLACIJA MED JAMSKIMI IN POVRŠINSKIMI ŽIVALMI

V preteklosti je bilo že precej raziskav posvečenih speciaciji jamskih živali, a so raziskovalci le redko neposredno testirali posamezno reproduktivno bariero med jamsko in površinsko populacijo ali vrsto (Trontelj, 2012). Ne poznamo pa nobene raziskave, v kateri bi preverili naravo reproduktivne izolacije med različnimi jamskimi vrstami. Reprodukativna izolacija je verjetno najbolj raziskana med jamskimi in površinskimi populacijami ribe *Poecillia mexicana*. Tobler (2009) je pokazal neviabilnost imigrantov zaradi plenjenja vodne stenice *Belostoma* sp. Osebki *P. mexicana* iz jamske populacije so bili v površinskem okolju bolj dovzetni za napade te plenilske stenice kot v

podzemlju, osebki iz površinske populacije pa ravno obratno. Večja smrtnost imigrantov v tujem habitatu pomeni manj možnosti navzkrižnega parjenja in deluje kot reproduktivna bariera.

Neviabilnost imigrantov pri ribah *Poecillia mexicana* so pokazali tudi Riesch in sodelavci (2011). V enoletnem poskusu so osebke jamske in površinske populacije gojili v temi in na dnevno-nočnem ciklu. Površinski osebki, ki so jih gojili v temi, so imeli nižji razmnoževalni uspeh, bili dovzetnejši za boleznin in imeli višjo smrtnost kot površinski osebki, ki so jih gojili na dnevno-nočnem ciklu. Pri jamskih osebkih podobnih razlik ni bilo. V tej raziskavi so torej pokazali način, kako lahko svetloba deluje kot reproduktivna bariera med jamsko in površinsko populacijo.

Vendar bi svetloba lahko bila pomembna tudi pri nastanku drugih oblik reproduktivne izolacije. Ker je svetloba tisti okoljski dejavnik, ki najočitneje ločuje podzemeljsko in površinsko okolje (Pipan in Culver, 2012), jo verjetno vsaj nekatere živali izkoriščajo za orientacijo in prepoznavo ustreznega habitata (Fišer in sod., 2016). Različen vedenjski odziv na svetlobo kot del izbire habitata jamske in površinske populacije bi privedel do različne razporeditve enih in drugih osebkov vzdolž svetlobnega gradienta med podzemljem in površjem. Zaradi tega je verjetnost srečevanj in tudi parjenja med osebki obeh populacij zmanjšana. Ker gre za oviro genskemu pretoku med populacijama, predstavlja to vedenje reproduktivno bariero. Opišemo jo lahko kot primer habitatne izolacije in je v primeru jamskih in površinskih populacij smiselna le, ko so jamski osebki bolj fotofobni kot površinski. Vedenjski odziv na svetlobo kot reproduktivna bariera med jamskimi in površinskimi populacijami še ni bil raziskan.

## 1.5 VEDENJSKI ODZIV NA SVETLOBO

Kljub temu, da so jamske živali praviloma popolnoma brez oči in pigmentov ali pa so le-ti močno reducirani, se mnoge med njimi odzivajo na svetlobo (Langecker, 1992; Parzefall, 1996). Vedenjski odziv na svetlobo so najintenzivneje raziskovali pri ameriških jamskih ribah, manj pri jamskih nevretenčarjih.

Med najbolj preučeni je vedenjski odziv na svetlobo mehiške tetre *Astyanax mexicanus*, pri kateri so znane površinske in podzemeljske populacije. Pri površinskih



populacijah se fotofobnost povečuje z naraščajočo jakostjo svetlobe. Odziv površinskih osebkov je bil odvisen tudi od njihovega ontogenetskega razvoja; juvenilni osebki so bili namreč za razliko od odraslih fotofilni (Romero, 1985). Odrasli osebki iz jamskih populacij pa so bili fotofobni, a so se pri vseh jakostih svetlobi umaknili manj izrazito kot površinski osebki (Langecker, 1992).

Poleg mehiške tetre obstaja še nekaj jamskih rib, pri katerih so preučevali odziv na svetlobo. Green in Romero (1997) sta primerjala dve severnoameriški ribi iz družine Amblyopidae. S poskusi sta odkrila, da so se osebki vrste *Amblyopsis spelaea* odzivali na svetlobo fotofobno, osebki vrste *Typhlichthys subterraneus* pa se na svetlobo niso odzivali. Neodzivnost slednjih sta pripisala slabo razvitemu in nefunkcionalnemu pinealnemu organu. Zaključila sta, da evolucija vedenjskega odziva na svetlobo pri jamskih ribah kaže v smeri postopnih adaptacij na podzemlje.

Parzefall in sodelavci (2007) so izmerili vedenjski odziv na svetlobo jamske in površinske populacije vrste *Poecilia mexicana*. Osebki obeh populacij so pri vseh treh v poskusu uporabljenih jakostih svetlobe večino časa preživeli v osvetljenem delu akvarija. Njihovo vedenje je bilo torej fotofilno in se med ekomorfo ni razlikovalo. Ta primer kaže, da za uspešno naselitev podzemlja fotofobno vedenje ni nujno potrebna lastnost.

Raziskovalci so preučevali vedenjski odziv na svetlobo tudi pri dvoživkah, ki naseljujejo podzemlje. Pri pupkih *Calotriton asper* je bilo vedenje pri jamski populaciji bolj fotofobno kot pri površinski, a razlika ni bila statistično značilna (Lengvenus in Parzefall, 1992). Razlog za to je najverjetneje majhen vzorec testiranih živali; vedenje so izmerili le pri sedmih osebkih iz površinske in šestih osebkih iz jamske populacije. Steinfartz in sodelavci (2009) pa so preverili, kako se odziva na svetlobo človeška ribica (*Proteus anguinus*) in že pri nizki jakosti svetlobe (0,5 do 1,0 lx) zaznali fotofoben odziv. Vsi testirani osebki so se v nekaj sekundah po osvetlitvi skrili v temo.

Odziv na svetlobo so raziskovali tudi pri jamskih nevretenčarjih, in sicer največ pri rakih. Banta (1910) je preučeval vedenje dveh vrst enakonožnih rakov iz rodu *Caecidotea*, površinsko *C. communis* in jamsko *C. stygia*. Opazil je, da so se osebki

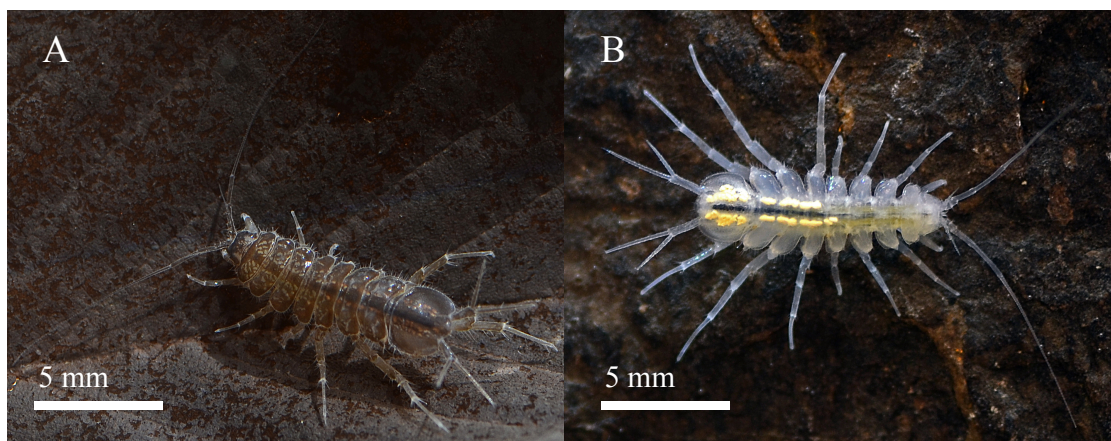
jamske vrste na svetlobo odzvali šele pri višji jakosti kot osebki površinske vrste. Borowsky (2011) je spremljala spremembo vedenja ob izpostavitvi močni in šibki svetlobi pri slepih postranicah *Niphargus frassianus* in *N. ictus* ter ugotovila, da so osebki obeh vrst fotofobni. Fotofobne so bile tudi vse izmed 10 vrst slepih postranic *Niphargus*, katerih vedenjski odziv na svetlobo so raziskovalci primerjali z odzivom površinskih postranic iz rodu *Gammarus* in *Echinogammarus*, ki z njimi sobivajo v izvirih (Fišer in sod., 2016). V isti raziskavi so pokazali še, da slepe postranice izkazujejo enako stopnjo fotofobnosti pri nižji jakosti svetlobe kot površinske postranice. Iz poskusov z dvema jamskima in dvema površinskima populacijama postranice *Gammarus minus* pa je razvidno, da so osebki obeh jamskih populacij manj fotofobni (Vawter in sod., 1987).

## 1.6 VODNI OSLIČEK

Sladkovodni rak enakonožec, vodni osliček *Asellus aquaticus* (L.) (Slika 1A), je splošno razširjen v mnogih tipih površinskih voda po večini Evrope. V Sloveniji, Italiji in Romuniji pa so znane tudi njegove podzemeljske populacije (Sket, 1994; Verovnik in sod., 2004). Kot za druge troglobiotske vrste sta tudi za jamske vodne osličke (Slika 1B) značilni redukcija oči in pigmenta ter podaljšane okončine (Turk in sod., 1996; Prevorčnik in sod., 2004).

Vodni osliček je pogost modelni organizem ekotoksikoloških raziskav (npr. Bouskill in sod., 2006; De Lange in sod., 2006), večkrat pa se omenja tudi kot modelni organizem za raziskave vodne ekologije (Hasu in sod., 2008), historične biogeografije (Verovnik, 2012) in razvojno-evolucijske (angl. evolutionary development; evo-devo) raziskave (Protas in Jeffery, 2012). Potencialen modelni organizem za raziskave ekološke speciacije pa je predvsem zaradi večkratnih neodvisnih vselitev v podzemlje in še živečih predniških površinskih populacij. Med jamskimi in površinskimi vodnimi oslički so do sedaj raziskovali predvsem razlike v morfologiji (Prevorčnik in sod., 2009; Konec in sod., 2015) in genetiki (Verovnik in sod., 2003; Verovnik in sod., 2004; Verovnik in sod., 2005; Protas in sod., 2011; Konec in sod., 2015; Stahl in sod., 2015). Fiziološke in vedenjske lastnosti, posebno jamskih populacij, pa so še vedno slabo raziskane.

Mösslacher in Creuze Des Chateliers (1996) sta preučevala prehranjevanje, gibanje in dihanje pri površinskih vodnih osličkih in pri jamskih vodnih osličkih iz Romunije (*A. aquaticus infernus*). Ugotovila sta, da se površinski vodni oslički manj gibljejo, več časa hranijo in porabijo več kisika kot vodni oslički iz romunske jamske populacije.



Slika 1: Površinski ekomorf (A) in jamski ekomorf (B) vodnega oslička *Asellus aquaticus* (Foto: Žiga Fišer)

Janzer in Ludwig (1952) sta raziskovala vedenjski odziv na svetlobo pri površinskih vodnih osličkih iz Nemčije. Ugotovila sta njihovo fotofobnost in tudi to, da so šibko pigmentirani osebki bolj fotofobni kot močno pigmentirani osebki. Tudi Novak (2014) ter Fišer in sodelavci (2016) so pokazali fotofobnost površinskih vodnih osličkov. Po drugi strani pa vedenjski odziv na svetlobo pri jamskih vodnih osličkih še ni poznan. Prav tako ne obstaja raziskava, v kateri bi raziskovalci primerjali vedenjski odziv na svetlobo površinskih in jamskih populacij vodnih osličkov.

## 1.7 HIPOTEZA RAZISKAVE

Namen magistrskega dela je preveriti hipotezo, da je v procesu adaptacije na podzemeljsko okolje prišlo do povečane občutljivosti oziroma močnejše reakcije na svetlobo, ker je naravna selekcija iz jamskih populacij izločala osebke, ki so šli predaleč ven na površje. Zato smo zasnovali poskus in izmerili vedenjski odziv na svetlobo več jamskih in njihovih predniških površinskih populacij vodnih osličkov. Napovedujemo, da bodo jamski vodni oslički bolj fotofobni kot površinski. V temo se bodo umaknili pri

nižji jakosti svetlobe (pražna jakost svetlobe bo pri njih nižja) in se vseh jakosti svetlobe izogibali izraziteje kot površinski.

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 IZBOR POPULACIJ IN VZORČENJE

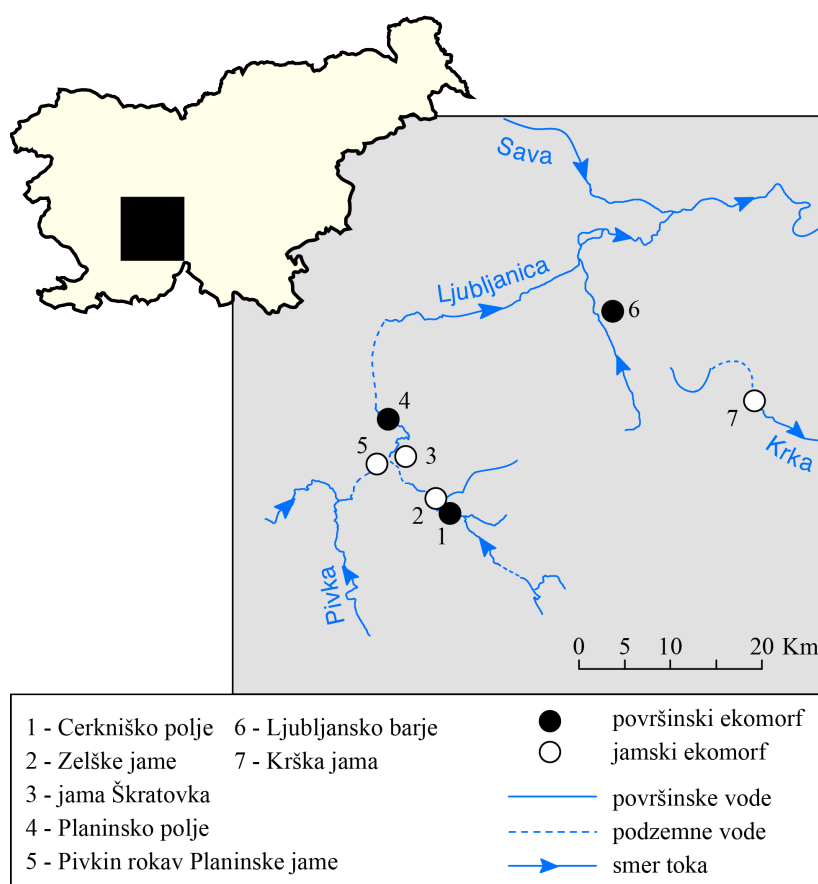
V raziskavi smo izmerili vedenjski odziv na svetlobo pri štirih jamskih in treh površinskih populacijah vodnega oslička *Asellus aquaticus*. Jamske populacije smo nabrali v Zelških jamah, jami Škratovki, Pivkinem rokavu Planinske jame in v Krški jami, površinske populacije pa na Cerkniskem polju, Planinskem polju in na Ljubljanskem barju. Glede na rezultate filogenetskih in populacijsko genetskih raziskav (Verovnik in sod., 2004) našete površinske populacije predstavljajo predniške ali pa najsorodnejše populacije izbranim jamskim populacijam. Pare predniške površinske in izpeljane jamske populacije tako predstavljajo: Zelške jame (in jama Škratovka) ter Cerknisko polje; Pivkin rokav Planinske jame in Planinsko polje; Krška jama in Ljubljansko barje. Lokacije vseh obravnavanih populacij prikazuje Slika 2. Natančnejši podatki o lokacijah so zbrani v Preglednici 1. V poskus smo vključili med 19 in 50 osebkov na populacijo (Preglednica 1).

Preglednica 1: Seznam lokacij jamskih in predniških površinskih populacij vodnih osličkov s podatki o datumu vzorčenja, datumu izvedbe poskusa, številom osebkov v poskusu (prva številka) in številom osebkov v končnih analizah (druga številka).

ID	lokaliteta	tip habitata	koordinate WGS84	ekomorf	datum vzorčenja	datum poskusa	število osebkov*
1	Cerkniško polje	površinski tok ponikalnice	N45.77305, E14.32532	površinski	16. 7. 2014	23. – 25. 7. 2014	50 / 41
2	Zelške jame (kš: 57)	podzemni tok ponikalnice	N45.79066, E14.30349	podzemni	16. 7. 2014	23. – 25. 7. 2014	50 / 39
3	jama Škratovka (kš: 800)	jamski potok	N45.82658, E14.26372	podzemni	23. 6. 2013	19. 2. 2014	19 / 19
4	Planinsko polje	površinski tok ponikalnice	N45.86872, E14.24313	površinski	9. 6. 2014	16. – 20. 6. 2014	40 / 33
5	Pivkin rokav Planinske jame (kš: 748)	podzemni tok ponikalnice	N45.81990, E14.24567	podzemni	9. 6. 2014	16. – 20. 6. 2014	50 / 50
6	Ljubljansko barje	odvodni jarek	N45.97232, E14.55906	površinski	11. 8. 2014	18. – 19. 8. 2014	39 / 37
7	Krška jama (kš: 74)	podzemni tok ponikalnice	N45.88999, E14.77126	podzemni	11. 8. 2014	18. – 19. 8. 2014	41 / 32

kš – katastrska številka jame, kot je zavedena v e-katastru jam.

\* – število osebkov v poskusu in število osebkov v končnih analizah se razlikujeta, ker smo med poskusom močno poškodovane in poginule osebkve izločili iz analize



Slika 2: Zemljevid lokacij jamskih in površinskih populacij vodnih osličkov (prirejeno po Fišer in sod., v pripravi). Številke lokacij se ujemajo s številkami (ID) v Preglednici 1.

Površinske vodne osličke smo lovili z vodno mrežo. Iz vzorca smo odstranili večje kose rastlinja, vzorec predstavili v banjico z vodo in s sesalko ali z žličko preložili vodne osličke v plastičen lonček z vodo. Jamske vodne osličke smo posesali s sesalko neposredno s skal in kamenja ali pa smo jih lovili v vodno mrežico po tem, ko smo jih previdno odstranili s substrata s sesalko, mehko pinceto ali roko. Nabirali smo le nepoškodovane odrasle (> 5 mm) osebkne obeh spolov. Vodne osličke smo po nabiranju nemudoma prepeljali v jamski laboratorij (tema, 10 °C) Katedre za zoologijo, Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete, kjer je potekala aklimacija in tudi vse meritve vedenjskega odziva na svetlobo. Prestavili smo jih v akvarije, kot vir hrane in skrivališč smo dodali še liste črne jelše (*Alnus glutinosa*).

## 2.2 AKLIMACIJA

Za površinske živali je menjavanje dneva in noči naraven okoljski pojav, na katerega so prilagojene s specifično dnevno-nočno (tj. diurnalno) ritmiko (Shettleworth, 2010). Po

drugi strani pa je za jamske živali naravno stanje v okolju stalna tema. Da lahko ustrezno primerjamo vedenje obeh ekomorfov, jih moramo aklimirati pri istih pogojih. V nasprotnem primeru ne bi mogli razločiti, ali so morebitne razlike v vedenjskem odzivu na svetlobo posledica okoljskih razlik, tj. različnih svetlobnih razmer, ali dednih genskih razlik med populacijami. Čeprav je raziskava Fišer in sod. (2016) pokazala, da pri postranicah iz rodov *Niphargus*, *Gammarus* in *Echinogammarus* med osebkami, aklimiranimi na dnevno-nočni cikel, in osebkami, aklimiranimi v temi, ni razlik ali pa so te zelo majhne, bi lahko vodni oslički izkazovali drugačno vedenje. Zato smo pri eni jamski (Pivkin rokav Planinske jame) in eni površinski (Planinsko polje) populaciji preverili, ali se vedenjski odziv na svetlobo razlikuje med osebkami, aklimiranimi na dnevno-nočni cikel, in osebkami, aklimiranimi v temi (Priloga A). Ker je bil statistično značilno različen le odziv različno aklimiranih osebkov jamske populacije pri najvišji jakosti svetlobe (glej Sliko A1 in Preglednico A1 v Prilogi A), smo vse ostale jamske in površinske populacije aklimirali le v temi. Aklimacija je v vseh primerih trajala vsaj en teden.

### 2.3 MERJENJE VEDENJSKEGA ODZIVA NA SVETLOBO

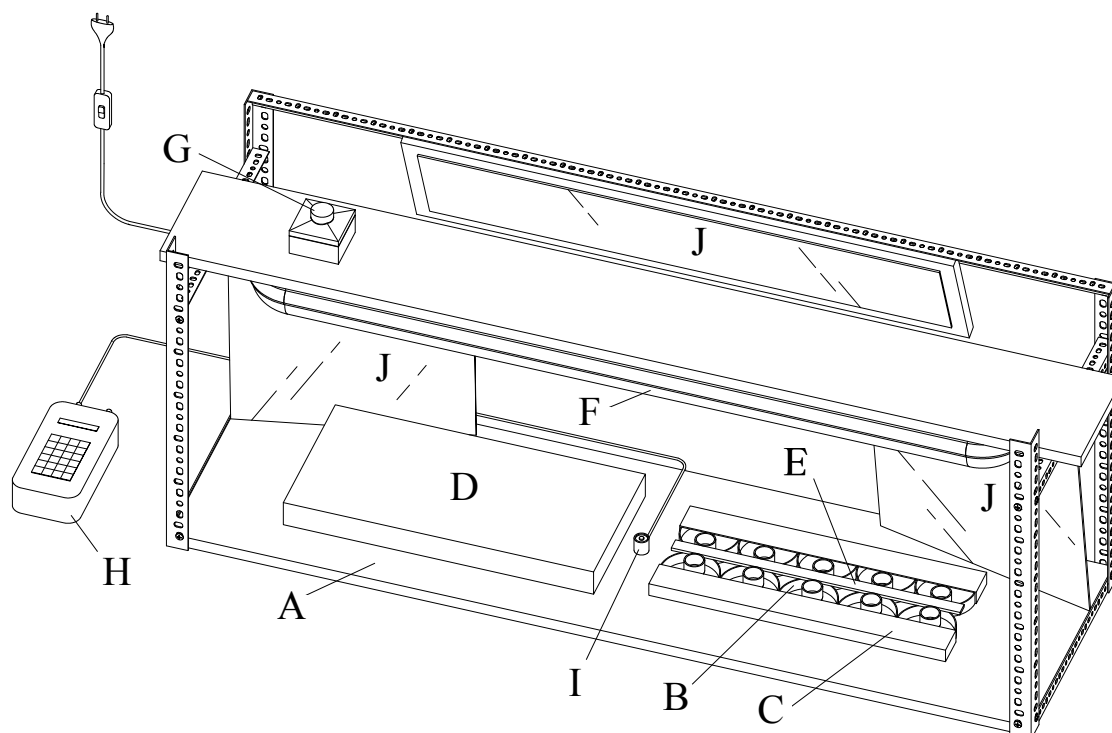
Postavitev poskusa in protokol meritev smo povzeli po raziskavah Novaka (2014) ter Fišerja in sodelavcev (2016), ki so ugotavljali, kakšen je vedenjski odziv na svetlobo pri slepih postranicah *Niphargus* in površinskih postranicah iz rodu *Gammarus* in *Echinogammarus*. Prilagodili smo ju tako, da sta bila primernejša za meritve vedenja vodnih osličkov in namen naše raziskave. Podobno metodologijo merjenja vedenjskega odziva na svetlobo so uporabili tudi avtorji predhodnih raziskav tega vedenja pri drugih jamskih vrstah (npr. Borowsky 2011; Friedrich in sod. 2011).

#### 2.3.1 Postavitev poskusa

Postavitev poskusa prikazuje Slika 3. Na delovno ploščo (Slika 3-A) smo postavili 20 steklenih petrijevok (Slika 3-B) s premerom 100 mm in višino 20 mm. Petrijevke smo prebarvali s črno bravo in tako preprečili potovanje svetlobe po steklu. Na dno petrijevok smo prilepili brusni papir granulacije P150, da so se vodni oslički lahko normalno gibali po hrapavi podlagi (Lozej, 2016). Čez petrijevke smo namestili pokrov (Slika 3-C), s čimer smo jih razdelili na osvetljeno in zatemnjeno polovico. Pripravili smo tudi

zaslombe (Slika 3-D), s katerimi smo med meritvami prekrili petrijevke, tako da so bile živali v temi ves čas, razen ko smo merili njihov vedenjski odziv. S premičnimi pregradami (Slika 3-E) smo med meritvami omejili živali na osvetljeno polovico petrijevke. Luč (Slika 3-F) smo namestili 40 cm nad petrijevkami. Za vir svetlobe smo uporabili dve 36 W fluorescentni sijalki (Osram FD T26 L 36W-954 G13 Daylight), ki posnemata naravni spekter svetlobe. Jakost svetlobe smo uravnavali z logaritemskim potenciometrom (Osram HF DIM P MCU) (Slika 3-G), merili pa s svetlomerom (Licor Li-1000 Data Logger) (Slika 3-H), čigar tipalo (LI-190 Quantum Sensor) (Slika 3-I) smo postavili na sredino delovne plošče. Za lažje opazovanje vedenja smo okoli petrijevke namestili tri zrcala (Slika 3-J), ki so tudi enakomernejše osvetlila delovno ploščo in petrijevke.





Slika 3: Postavitev poskusa za merjenje vedenjskega odziva na svetlobo. Na delovno ploščo (A), smo položili 20 črnih petrijevk s hrapavim dnom (B), in jih s pokrovom (C) razdelili na svetlo in temno polovico. Ko nismo izvajali meritev, smo čez petrijevke povezali zaslombo (D) in s tem preprečili osvetlitev živali. Pred pričetkom meritev smo živali s premičnimi pregradami (E) omejili na osvetljeno stran petrijevke. Z logaritemskim potenciometrom (G) smo uravnavali jakost svetlobe, ki smo jo merili s svetlometerom (H) in pripadajočim tipalom (I). Opazovanje živali smo si olajšali z zrcali (J). (Prirejeno po Novak, 2015)

### 2.3.2 Protokol meritev vedenjskega odziva na svetlobo

Vedenjski odziv na svetlobo smo merili pri petih jakostih svetlobe: 0,005; 0,05; 0,5; 5 in  $50 \mu\text{mol fotonov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Meritve smo vedno začeli s kontrolno meritvijo v temi, pri čemer smo si pomagali s šibko rdečo svetlobo (630 nm) naglavne svetilke Black Diamond Spot Headlamp. To je ustrezno, saj je znano, da večina rakov slabo zaznava svetlobo v rdečem delu spektra (Marshall in sod., 1999). Nadaljnje meritve so si vedno sledile od najšibkejše do najmočnejše jakosti svetlobe. Da smo dosegli jakost  $0,005 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , smo morali luč prekriti s črnim šeshamerjevim papirjem. Podobno smo jakost  $0,05 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  dosegli z uporabo belega šeshamerjevega papirja. Papirja sta delovala kot nevtralni oziroma neselektivni filter in sta spremenila le jakost, ne pa tudi barve (spektra) oddane svetlobe (Fišer Ž., ustno).

Med pripravljanjem živali in drugih potrebščin za meritve so bili vsi osebki v temi, mi pa smo si pri delu pomagali z že omenjeno naglavno svetilko z rdečo svetlobo. V petrijevke smo natočili 80 ml vode, ohlajene na 10 °C. V vsako petrijevko smo namestili po en osebek. Osebki so bili glede na lokacijo petrijevke na delovni plošči enakomerno porazdeljeni (površinski, jamski, površinski, jamski itd.). V vsakem poskusu smo hkrati opazovali 10 osebkov iz jamske in 10 osebkov iz predniške površinske populacije. Izjema so bili le osebki iz jame Škratovke, kjer predniške površinske populacije nismo opazovali sočasno. Pred vsako meritvijo smo osebke s premičnimi pregradami (obročki) omejili na osvetljeno polovico petrijevke. Tako smo zagotovili, da so ob začetku poskusa vsi prišli v stik s svetlobo. Nato smo jih prekrili z zaslombo in pustili 15 minut, da se umirijo po našem, zanje morebiti stresnem, rokovanju z njimi. Poskus se je začel s prižigom luči (pri kontrolni meritvi je luč ostala ugasnjena) ter odstranitvijo zaslomb in premičnih pregrad. Živali smo potem opazovali 15 minut in vsakih 30 sekund zabeležili, ali se nahajajo na osvetljeni ali zatemnjeni polovici petrijevke. Opisani postopek smo potem ponovili pri vseh nadaljnjih jakostih svetlobe.

Po končanih meritvah smo pod stereomikroskopom vsem osebkom po obliki gonopodov določili spol in si zabeležili morebitne telesne poškodbe. Močno poškodovane in poginule osebke smo izločili iz končnih statističnih analiz. Število izločenih osebkov pri posamezni populaciji je razvidno iz Preglednice 1.

## 2.4 ANALIZA PODATKOV

Podatke smo analizirali s programom R 3.3.0 (R Core Team, 2016). V analizi smo upoštevali le meritve zadnjih desetih minut, saj v prvih petih minutah odziv še ni bil ustaljen. Uporabili smo posplošen linearni mešani model (v nadaljevanju GLMM) z binomsko porazdeljenimi ostanki in vezno funkcijo logit v R paketu *lme4* (Bates in sod., 2016). Izračunali smo tri tipe modelov, v katere smo vključili različne podatke in neodvisne spremenljivke. Odvisno spremenljivko je vedno predstavljal vedenjski odziv vodnih osličkov, ki smo ga beležili z 0 (osebek se nahaja na osvetljeni polovici) in 1 (osebek se nahaja na zatemnjeni polovici). Če za posamezen osebek izračunamo povprečje teh vrednosti pri eni jakosti svetlobe, njegovo vedenje ocenimo z eno številko

(0-0,5 = fotofilija; 0,5 = fotonevtralnost; 0,5-1 = fotofobija). Kot naključni učinek (angl. random effect) smo obravnavali posamezne osebkke. Teste mnogoterih primerjav za vse tri tipe modelov smo izvedli s funkcijo *glht* v R paketu *multcomp* (Hothorn in sod., 2009, Hothorn in sod. 2016), pri čemer smo p-vrednost popravili z metodo single-step. Grafe smo izrisali s funkcijami v R paketu *ggplot2* (Wickham, 2009).

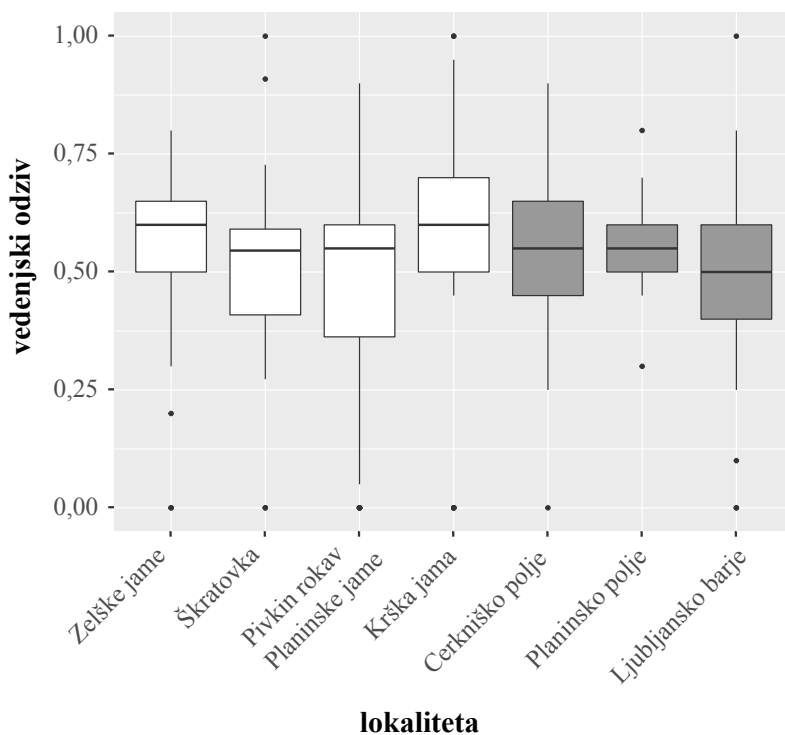
V prvi tip modela (M1) smo vključili le podatke kontrolnih poskusov (meritve v temi) vseh jamskih in površinskih populacij. Kategorično neodvisno spremenljivko je predstavljala populacija (Cerkniško polje, Zelške jame, jama Škratovka, Planinsko polje, Pivkin rokav Planinske jame, Ljubljansko barje, Krška jama). Preverili smo, ali je vedenjski odziv vodnih osličkov v temi enak naključni izbiri obeh polovic petrijevke, tj. naključnemu gibanju po petrijevki. Ocenjene vrednosti odziva in pripadajoče 95-odstotne intervale zaupanja smo s funkcijo *inv.logit* v R paketu *boot* (Davison in Hinkley, 1997; Canty in Ripley, 2016) preračunali nazaj v verjetnost.

V drugi tip modela (M2) smo vključili podatke vseh meritev posamezne populacije razen kontrolne meritve v temi. Kategorično spremenljivko je predstavljala jakost svetlobe (0,005; 0,05; 0,5; 5; 50). Najprej smo preverili ali se odziv pri vsaki posamezni jakosti svetlobe razlikuje od naključne izbire polovic petrijevke. Tako smo določili prazno jakost svetlobe za posamezno populacijo, tj. jakost svetlobe, na katero se osebki statistično značilno odzovejo. Nadalje smo primerjali še odziv pri vseh parih zaporednih jakosti svetlobe (npr. 0,05 – 0,005; 0,5 – 0,05; ...). S tem smo podrobneje preverili, kako se vedenjski odziv posamezne populacije spreminja z naraščajočo jakostjo svetlobe.

V tretji tip modela (M3) smo vključili podatke vseh meritev (razen kontrolnih meritev v temi) določene jamske in pripadajoče predniške površinske populacije. Kategorični neodvisni spremenljivki sta bili jakost svetlobe in ekomorf (jamski, površinski); v modelu smo upoštevali tudi njuno interakcijo. Tu smo pri vseh jakostih svetlobe primerjali vedenjski odziv jamske in predniške površinske populacije.

### 3 REZULTATI

Pri kontrolnih meritvah v temi je vedenjski odziv vodnih osličkov ustrezal naključnemu gibanju po petrijevki oziroma naključni izbiri obeh polovic petrijevke (številčna ocena odziva se ni statistično značilno razlikovala od 0,5) (Slika 4, Preglednica 2).



Slika 4: Vedenjski odziv v temi vseh jamskih in površinskih populacij vodnih osličkov. Vrednost vedenjskega odziva 0,5 predstavlja naključno izbiro obeh polovic petrijevke, vrednosti med 0 in 0,5 predstavljajo izbiro prve polovice, vrednosti med 0,5 in 1 pa izbiro druge polovice.

Preglednica 2: Primerjava vedenjskega odziva v temi s pričakovano naključno izbiro obeh polovic petrijevke (vrednost odziva = 0,5). Vedenjski odziv in pripadajoči 95-odstotni interval zaupanja sta podana kot verjetnost.

populacija	ekomorf	vedenjski odziv [95 % IZ]	p - vrednost
Zelške jame	jamski	0,55 [0,48; 0,62]	0,26
jama Škratovka	jamski	0,51 [0,40; 0,61]	> 0,99
Pivkin rokav Planinske jame	jamski	0,44 [0,38; 0,50]	0,06
Krška jama	jamski	0,57 [0,50; 0,64]	0,06
Cerkniško polje	površinski	0,55 [0,48; 0,62]	0,26
Planinsko polje	površinski	0,55 [0,48; 0,62]	0,32
Ljubljansko barje	površinski	0,49 [0,42; 0,56]	> 0,99

Vedenjski odziv na svetlobo je bil pri različnih jamskih populacijah različen, pri različnih površinskih populacijah pa podoben (Slika 5, Preglednica 3, Preglednica 4). Populaciji iz Zelških jam (Slika 5-A) in jame Škratovke (Slika 5-B) sta bili obe izrazito fotofobni, statistično značilno sta se umaknili že svetlobi najnižje jakosti. Pražna jakost svetlobe je pri teh dveh populacijah torej znašala  $0,005 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Preglednica 3). Tudi pri vseh višjih jakostih svetlobe je bil odziv statistično značilno fotofoben, izrazitost umika svetlobi se je povečevala z naraščajočo jakostjo svetlobe (Preglednica 4). Pri populaciji iz Zelških jam je bil odziv pri  $0,05 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  značilno bolj fotofoben kot pri  $0,005 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Odzivi pri 0,5; 5 in  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  se med seboj niso značilno razlikovali, a so bili značilno bolj fotofobni kot odziv pri  $0,05 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Pri populaciji iz jame Škratovke se odziva pri 0,005 in  $0,05 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  med seboj nista značilno razlikovala, a sta bila značilno manj fotofobna kot odzivi pri 0,5; 5 in  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ki pa se med seboj tudi niso značilno razlikovali.

Pri jamski populaciji iz Pivkinoga rokava Planinske jame (Slika 5-C) in Krške jame (Slika 5-D) je bil vedenjski odziv na svetlobo izrazito manj fotofoben kot pri obeh zgoraj omenjenih populacijah. Veliko večja je bila tudi variabilnost odziva. Vodni oslički iz Pivkinoga rokava Planinske jame so se statistično značilno fotofobno odzvali pri jakosti svetlobe  $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , vodni oslički iz Krške jame pa šele pri največji jakosti svetlobe, tj.  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Preglednica 3). Pražni jakosti svetlobe sta torej pri

teh dveh populacijah visoki. Pri populaciji iz Pivkinega rokava Planinske jame se odziva pri 0,005 in 0,05  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  nista značilno razlikovala. Presenetljivo je, da je bil odziv pri 0,5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  značilno manj fotofoben kot pri predhodni jakosti 0,05  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Pri obeh najvišjih jakostih svetlobe (5 in 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) so bili oslički značilno bolj fotofobni kot pri obeh predhodnih nižjih jakostih svetlobe (0,5 in 5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Preglednica 4). Pri populaciji iz Krške jame je bil odziv pri 0,05  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  značilno bolj fotofoben kot odziv pri 0,005  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Odzivi pri jakostih 0,05; 0,5 in 5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  se med seboj niso značilno razlikovali. Statistično značilno bolj fotofoben je bil šele odziv pri 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Preglednica 4).

Pri vseh treh površinskih populacijah je bil vedenjski odziv na svetlobo podoben, zmerno fotofoben (Slika 6). Tudi prazna jakost svetlobe je bila pri vseh populacijah enaka najnižji jakosti svetlobe uporabljene v poskusih, tj. 0,005  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Preglednica 3). Pri populaciji iz Cerkniškega polja je odziv počasi naraščal z naraščajočo jakostjo svetlobe, a je bil med dvema zaporednima jakostma statistično značilno bolj fotofoben le med 0,05 in 0,005  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Preglednica 4). Podobno je bilo tudi pri populaciji iz Planinskega polja, le da med nobenima zaporednima jakostma svetlobe ni bilo značilnih razlik. Pri populaciji iz Ljubljanskega barja se odziva pri 0,005 in 0,05  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  med seboj nista razlikovala, a sta bila značilno manj fotofobna kot odziva pri 0,5 in 5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Tudi slednja se med seboj nista značilno razlikovala, a sta bila značilno manj fotofobna kot odziv pri 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

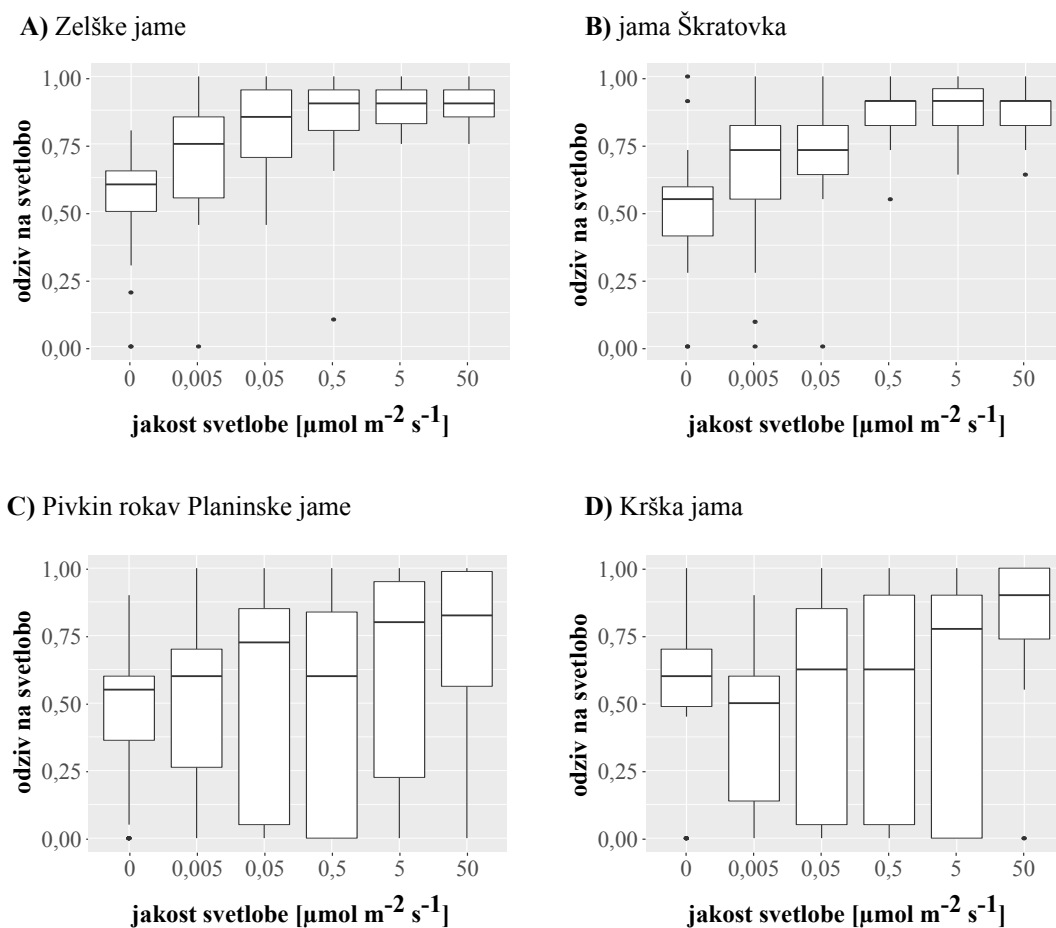
Preglednica 3: Primerjava odziva pri posameznih jakostih svetlobe z naključno izbiro polovic petrijevke (»nič«) (rezultati primerjav znotraj modelov drugega tipa, M2) pri jamskih in površinskih populacijah vodnih osličkov. Pražne jakosti svetlobe so podčrtane in označene krepko. Ocena razlike s pripadajočim 95-odstotnim intervalom zaupanja je izražena na logit skali.

populacija	primerjava svetlobe [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	ocena razlike [95 % IZ]	p - vrednost
Zelške jame	<b><u>0,005 - nič</u></b>	0,93 [0,60; 1,25]	< <b>0,001</b>
	0,05 - nič	1,57 [1,22; 1,91]	< <b>0,001</b>
	0,5 - nič	1,98 [1,61; 2,35]	< <b>0,001</b>
	5 - nič	2,19 [1,81; 2,58]	< <b>0,001</b>
	50 - nič	2,45 [2,05; 2,86]	< <b>0,001</b>
jama Škratovka	<b><u>0,005 - nič</u></b>	0,61 [0,15; 1,06]	<b>0,003</b>
	0,05 - nič	0,85 [0,39; 1,32]	< <b>0,001</b>
	0,5 - nič	1,77 [1,21; 2,33]	< <b>0,001</b>
	5 - nič	1,97 [1,38; 2,57]	< <b>0,001</b>
	50 - nič	1,97 [1,38; 2,57]	< <b>0,001</b>
Pivkin rokav Planinske jame	0,005 - nič	- 0,04 [- 0,49; 0,41]	> 0,99
	0,05 - nič	0,16 [- 0,29; 0,61]	0,70
	0,5 - nič	- 0,18 [- 0,63; 0,27]	0,61
	<b><u>5 - nič</u></b>	0,59 [0,14; 1,05]	<b>0,007</b>
	50 - nič	1,03 [0,58; 1,50]	< <b>0,001</b>
Krška jama	0,005 - nič	- 0,42 [- 0,94; - 0,08]	0,11
	0,05 - nič	0,01 [- 0,50; 0,51]	< 0,99
	0,5 - nič	0,02 [- 0,48; 0,53]	< 0,99
	5 - nič	0,07 [- 0,44; 0,57]	0,99
	<b><u>50 - nič</u></b>	1,83 [1,30; 2,37]	< <b>0,001</b>
Cerkniško polje	<b><u>0,005 - nič</u></b>	0,41 [0,07; 0,74]	<b>0,01</b>
	0,05 - nič	0,70 [0,36; 1,03]	< <b>0,001</b>
	0,5 - nič	0,93 [0,59; 1,27]	< <b>0,001</b>
	5 - nič	1,14 [0,79; 1,48]	< <b>0,001</b>
	50 - nič	1,31 [0,96; 1,67]	< <b>0,001</b>
Planinsko polje	<b><u>0,005 - nič</u></b>	0,60 [0,23; 0,98]	< <b>0,001</b>
	0,05 - nič	0,67 [0,30; 1,04]	< <b>0,001</b>
	0,5 - nič	0,87 [0,50; 1,25]	< <b>0,001</b>
	5 - nič	1,06 [0,69; 1,45]	< <b>0,001</b>
	50 - nič	1,36 [0,97; 1,75]	< <b>0,001</b>
Ljubljansko barje	<b><u>0,005 - nič</u></b>	0,49 [0,19; 0,78]	< <b>0,001</b>
	0,05 - nič	0,53 [0,23; 0,83]	< <b>0,001</b>
	0,5 - nič	1,06 [0,75; 1,37]	< <b>0,001</b>
	5 - nič	0,98 [0,67; 1,29]	< <b>0,001</b>
	50 - nič	1,49 [1,17; 1,82]	< <b>0,001</b>

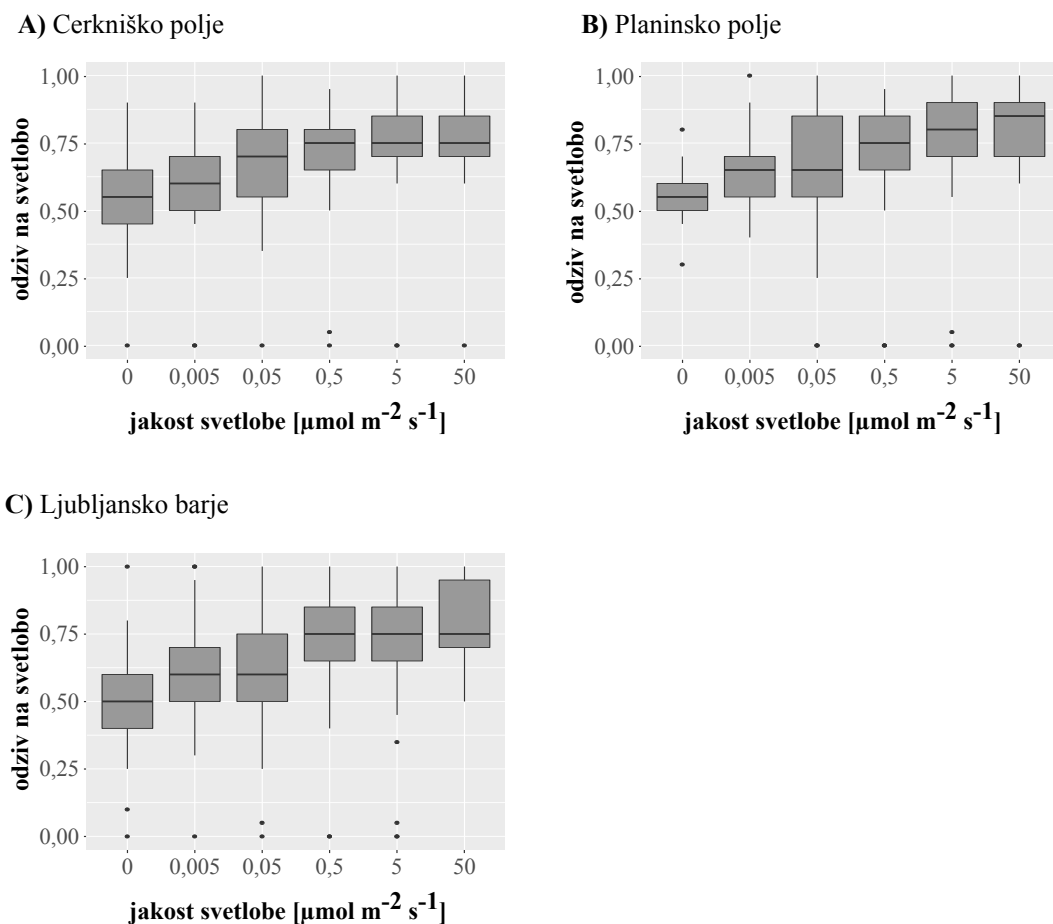
Preglednica 4: Primerjava odziva pri dveh zaporednih jakostih svetlobe (rezultati primerjav znotraj modelov drugega tipa, M2) pri jamskih in površinskih populacijah vodnih osličkov. »Nič« predstavlja naključno izbiro polovic petrijevke. Ocena razlike s pripadajočim 95-odstotnim intervalom zaupanja je izražena na logit skali.

populacija	primerjava svetlobe [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	ocena razlike [95 % IZ]	p - vrednost
Zelške jame	0,005 - nič	0,93 [0,60; 1,26]	< <b>0,001</b>
	0,05 - 0,005	0,64 [0,32; 0,95]	< <b>0,001</b>
	0,5 - 0,05	0,42 [0,05; 0,79]	<b>0,01</b>
	5 - 0,5	0,21 [- 0,19; 0,60]	0,58
	50 - 5	0,26 [- 0,17; 0,69]	0,44
jama Škratovka	0,005 - nič	0,61 [0,16; 1,06]	<b>0,003</b>
	0,05 - 0,005	0,25 [- 2,91; 0,78]	0,69
	0,5 - 0,05	0,92 [0,29; 1,54]	< <b>0,001</b>
	5 - 0,5	0,20 [- 0,52; 0,92]	0,93
	50 - 5	< 0,001 [- 0,74; 0,74]	< 0,99
Pivkin rokav Planinske jame	0,005 - nič	- 0,04 [- 0,54; 0,46]	> 0,99
	0,05 - 0,005	0,20 [- 0,06; 0,46]	0,21
	0,5 - 0,05	- 0,34 [- 0,60; - 0,08]	<b>0,004</b>
	5 - 0,5	0,77 [0,51; 1,04]	< <b>0,001</b>
	50 - 5	0,44 [0,16; 0,72]	< <b>0,001</b>
Krška jama	0,005 - nič	- 0,43 [- 0,97; 0,11]	0,18
	0,05 - 0,005	0,43 [0,11; 0,76]	<b>0,003</b>
	0,5 - 0,05	0,01 [- 0,30; 0,34]	> 0,99
	5 - 0,5	0,05 [- 0,27; 0,37]	> 0,99
	50 - 5	1,77 [1,39; 2,14]	< <b>0,001</b>
Cerkniško polje	0,005 - nič	0,41 [0,06; 0,75]	<b>0,01</b>
	0,05 - 0,005	0,29 [0,02; 0,56]	<b>0,03</b>
	0,5 - 0,05	0,23 [- 0,05; 0,52]	0,15
	5 - 0,5	0,20 [- 0,09; 0,50]	0,31
	50 - 5	0,18 [- 0,13; 0,49]	0,49
Planinsko polje	0,005 - nič	0,60 [0,22; 0,99]	< <b>0,001</b>
	0,05 - 0,005	0,06 [- 0,24; 0,37]	0,98
	0,5 - 0,05	0,20 [- 0,11; 0,52]	0,36
	5 - 0,5	0,19 [- 0,13; 0,52]	0,45
	50 - 5	0,29 [- 0,05; 0,63]	0,12
Ljubljansko barje	0,005 - nič	0,49 [0,19; 0,79]	< <b>0,001</b>
	0,05 - 0,005	0,04 [- 0,24; 0,32]	0,99
	0,5 - 0,05	0,53 [0,23; 0,82]	< <b>0,001</b>
	5 - 0,5	- 0,08 [- 0,38; 0,22]	0,95
	50 - 5	0,51 [0,19; 0,83]	< <b>0,001</b>





Slika 5: Vedenjski odziv na svetlobo jamskih populacij vodnih osličkov. Vrednost odziva 0,5 pomeni fotonevtralen odziv, vrednosti med 0 in 0,5 predstavljajo fotofilno vedenje, vrednosti med 0,5 in 1 pa fotofobno vedenje. Razmiki med kategorijami jakosti svetlobe so predstavljeni kot na logaritemski skali.



Slika 6: Vedenjski odziv na svetlobo površinskih populacij vodnih osličkov. Vrednost odziva 0,5 pomeni fotonevtralen odziv, vrednosti med 0 in 0,5 predstavljajo fotofilno vedenje, vrednosti med 0,5 in 1 pa fotofobno vedenje. Razmiki med kategorijami jakosti svetlobe so predstavljeni kot na logaritemski skali.

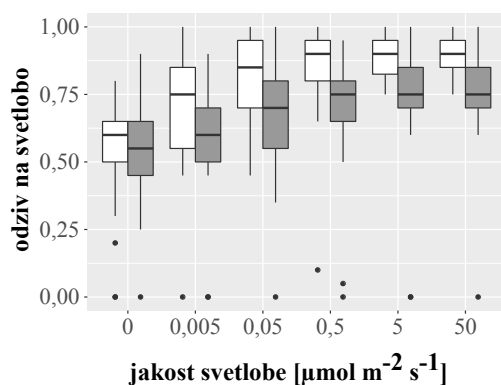
Odziv vsake izmed jamskih populacij se je od odziva pripadajoče predniške površinske populacije statistično značilno razlikoval vsaj pri dveh različnih jakostih svetlobe (Slika 7, Preglednica 5). Vodni oslički iz populacije v Zelških jamah so bili pri vseh petih jakostih svetlobe statistično značilno bolj fotofobni kot vodni oslički iz Cerkljanskega polja (Slika 7-A, Preglednica 5). Nasprotno so bili vodni oslički iz populacije v Pivkinem rokavu Planinske jame značilno manj fotofobni kot vodni oslički iz Planinskega polja pri najnižji in srednji jakosti svetlobe ( $0,005$  in  $0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), pri ostalih jakostih pa njihov odziv ni bil značilno različen (Slika 7-B, Preglednica 5). Podobno razliko v vedenjskem odzivu na svetlobo smo ugotovili tudi med vodnimi oslički iz Krške jame in Ljubljanskega barja (Slika 7-C, Preglednica 5). Tu so bili jamski osebki statistično značilno manj fotofobni kot površinski pri treh jakostih

svetlobe (0,005; 0,5; 5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), pri ostalih pa značilnih razlik v odzivu na svetlobo ni bilo.

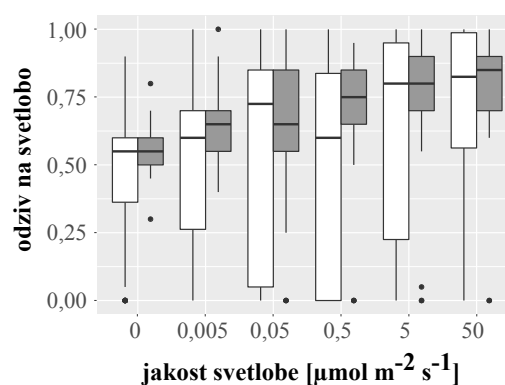
Preglednica 5: Primerjava vedenjskega odziva na svetlobo jamskih in pripadajočih predniških površinskih populacij pri isti jakosti svetlobe (rezultati primerjav znotraj modelov tretjega tipa, M3). Ocena razlike in pripadajoči 95-odstotni interval zaupanja sta izražena na logit skali. Pozitivne vrednosti razlike pomenijo bolj fotofoben odziv jamske populacije, negativne vrednosti pa bolj fotofoben odziv površinske populacije.

Populacijski par	jakost svetlobe [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	ocena razlike [95 % IZ]	p - vrednost
Zelške jame – Cerknjsko polje	0,005	0,52 [0,06; 0,99]	<b>0,02</b>
	0,05	0,87 [0,39; 1,35]	< <b>0.001</b>
	0,5	1,06 [0,55; 1,56]	< <b>0.001</b>
	5	1,06 [0,54; 1,58]	< <b>0.001</b>
	50	1,15 [0,61; 1,68]	< <b>0.001</b>
Planinska jama - Planinsko polje	0,005	- 0,65 [- 1,28; - 0,02]	<b>0,04</b>
	0,05	- 0,52 [- 1,15; 0,11]	0,13
	0,5	- 1,06 [-1,70; - 0,43]	< <b>0.001</b>
	5	- 0,49 [- 1,13; 0,15]	0,16
	50	- 0,35 [- 0,99; 0,30]	0,42
Krška jama - Ljubljansko barje	0,005	- 0,91 [- 1,49; - 0,34]	< <b>0.001</b>
	0,05	- 0,53 [- 1,10; - 0,04]	0,07
	0,5	- 1,05 [- 1,62; - 0,47]	< <b>0.001</b>
	5	- 0,92 [- 1,49; - 0,34]	< <b>0.001</b>
	50	0,30 [- 0,31; 0,91]	0,52

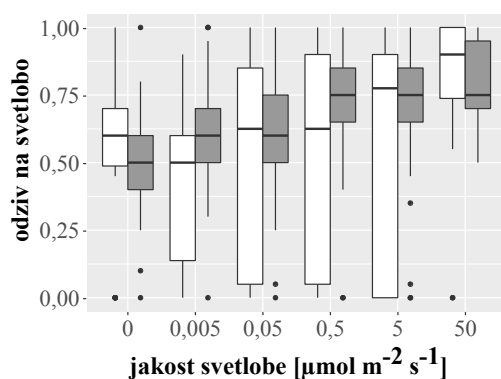
A) Zelške jame (☐) in Cerčniško polje (◐)



B) Pivkin rokav Planinske jame (☐) in Planinsko polje (◐)



C) Krška jama (☐) in Ljubljansko barje (◐)



Slika 7: Primerjava vedenjskega odziva na svetlobo jamskih in pripadajočih predniških površinskih populacij vodnih osličkov. Vrednost odziva 0,5 pomeni fotonevtralen odziv, vrednosti med 0 in 0,5 predstavljajo fotofilno vedenje, vrednosti med 0,5 in 1 pa fotofobno vedenje. Razmiki med kategorijami jakosti svetlobe so predstavljeni kot na logaritemski skali.

## 4 RAZPRAVA

### 4.1 VEDENJSKI ODZIV NA SVETLOBO JAMSKIH IN POVRŠINSKIH POPULACIJ

Kot smo pričakovali, so bili tako površinski kot jamski vodni oslički fotofobni. Vse površinske populacije so imele podoben fotofoben odziv, odziv jamskih populacij pa je bil presenetljivo različen. Fotofobnost površinskih populacij se sklada z rezultati preteklih raziskav (Janzer in Ludwig, 1952; Novak, 2014; Fišer in sod. 2016). V nasprotju z našimi napovedmi prazna jakost svetlobe jamske populacije v nobenem primeru ni bila nižja od prazne jakosti površinske populacije. Le jamski oslički iz Zelških jam so bili pri vseh jakostih svetlobe izraziteje bolj fotofobni kot vodni oslički iz njihove predniške površinske populacije s Cerkniškega polja. Jamske populacije torej niso bile v vseh primerih bolj fotofobne od površinskih. Razlike vedenja med izpeljano jamsko in predniško površinsko populacijo niso bile enake med različnimi pari, kar tudi ni skladno z našimi začetnimi pričakovanji.

Vedenjski odziv jamskih populacij iz Zelških jam in jame Škratovke je bil zelo podoben. Vodni oslički iz Zelških jam in jame Škratovke genetsko pripadajo isti širši populaciji in so se razvili iz skupne predniške površinske populacije (Konec, 2015). Velika podobnost vedenjskega odziva na svetlobo osebkov teh dveh jamskih populacij, zato ni presenetljiva.

Odziv vodnih osličkov iz Pivkinega rokava Planinske jame je bil nepričakovano zelo variabilen. Naknadno smo ugotovili, da so bili mnogi osebki te jamske populacije okuženi s paraziti ježerilci (*Acanthocephala*). Opazili smo jih šele po končanih meritvah, med določanjem spola in iskanjem morebitnih telesnih poškodb poskusnih osebkov pod stereomikroskopom. Ježerilci imajo zapleten življenjski cikel, v katerem navadno izmenjajo več gostiteljev. Med vmesne gostitelje nekaterih vrst sodi tudi vodni osliček, parazite so večkrat odkrili pri površinskih populacijah (npr. Bratney, 1986). Med našo raziskavo smo jih prvič odkrili tudi v jamski populaciji vodnih osličkov. Razvojna faza ježerilcev v vmesnem gostitelju se imenuje cistakant, parazit pa v tem stadiju še ni povsem odrasel, saj še nima popolnoma razvitih spolnih organov. Znano je, da ježerilci lahko spremenijo vedenje svojih gostiteljev na način, ki poveča verjetnost za

uspešno nadaljevanje njihovega življenjskega cikla. Pogosto spremenijo ravno vedenjski odziv na svetlobo svojega vmesnega gostitelja. Raziskovalci so na primer pokazali, da nekatere vrste postranic po okužbi postanejo manj fotofobne ali celo fotofilne (Bethel in Holmes, 1973; Cezilly in sod., 2000; Bauer in sod., 2000). Sprememba vedenja poveča verjetnost, da jih na svetlem opazi in zaužije končni gostitelj, ponavadi riba ali ptica.

Veliko variabilnost odziva vodnih osličkov iz Pivkinega rokava Planinske jame torej pripisujemo okuženosti mnogih osebkov z ježerilci. Zaradi tega so zelo verjetno pri tej populaciji popačene tudi srednje vrednosti vedenja. Za pravilno oceno vedenjskega odziva na svetlobo te populacije bo treba ponoviti meritve le z neokuženimi vodnimi oslički. Ker se okuženim površinskim osebkom fotofobnost zmanjša, bi pri neokuženih jamskih osebkih te populacije pričakovali fotofobnejši odziv. Zanimiva pa bi bila tudi primerjava vedenja okuženih in neokuženih osebkov iste populacije, saj lahko ima prisotnost parazitov velik vpliv na njihovo distribucijo in speciacijo (Bauer in sod., 2000; Cezilly in sod., 2000). V nadaljnjih raziskavah bo nujno preveriti prisotnost teh in morebitnih ostalih parazitov že pred aklimacijo in meritvami vedenja.

Veliko variabilnost odziva na svetlobo smo zaznali tudi pri vodnih osličkih iz Krške jame. Populacija vodnih osličkov v Krški jami je tudi morfološko bolj variabilna kot ostale jamske populacije, ki smo jih vključili v raziskavo, zato najverjetneje predstavlja bolj nedavno vselitev v podzemlje; je torej mlajšega nastanka (Verovnik in sod. 2004). Osebkovi te populacije so morfološko raznoliki, nekateri imajo oči in so pigmentirani, drugi pa oči nimajo in so manj pigmentirani (Sket, 1994). V statistični analizi teh morfoloških razlik in njihovega potencialnega vpliva na vedenjski odziv nismo mogli preveriti, ker smo imeli na razpolago premalo osebkov z enakimi morfološkimi znaki.

#### 4.2 VEDENJSKI ODZIV NA SVETLOBO KOT REPRODUKTIVNA BARIERA

Predvidevali smo, da lahko svetloba in vedenjski odziv nanjo kot del mehanizma izbire habitata vodita v habitatno izolacijo in delujeta kot reproduktivna bariera med jamskimi in površinskimi populacijami. Rezultati naše raziskave kažejo, da je to mogoče v primeru jamske populacije iz Zelških jam in njene predniške površinske populacije s Cerknškega polja. Vodni oslički iz te jamske populacije so bili pri vseh jakostih

svetlobe izraziteje bolj fotofobni kot njihovi površinski predniki. Takšna razlika vedenja lahko pripelje do delne habitatne izolacije in zmanjšanega genskega pretoka. Vedenjski odziv jamskih populacij iz Pivkinega rokava Planinske jame in Krške jame je bil pri različnih jakostih svetlobe enako ali pa manj fotofoben kot odziv predniških površinskih populacij s Planinskega polja in z Ljubljanskega barja, zato to vedenje ne more delovati kot reproduktivna bariera med njimi.

Vedenjski odziv na svetlobo verjetno deluje kot reproduktivna bariera le pri nekaterih parih jamskih in površinskih populacij vodnega oslička. Vendar se je odziv na svetlobo izkazal za bolj zapleteno vedenje, kot smo pričakovali, zato bodo do dokončnega sklepa potrebni še nadaljnji poskusi. Zanimivo bi bilo preveriti, ali svetloba tudi pri vodnih osličkih povzroči neviabilnost imigrantov. Podobno kot Riesch in sodelavci (2011) bi lahko v laboratoriju gojili nekaj generacij jamskih in površinskih populacij na svetlobi in v temi in spremljali njihovo preživetje in stopnjo razmnoževanja. Obstajajo pa tudi številni drugi zunanji dejavniki, ki bi lahko sodelovali pri nastanku reproduktivne bariere. Lozej (2016) je na primer preverila vpliv tipa podlage in iskanja zatočišč. Poleg tega bi lahko preverili tudi uspešnost križancev v površinskem in podzemeljskem okolju.

#### 4.3 EVOLUCIJA VEDENJSKEGA ODZIVA NA SVETLOBO PRI JAMSKIH ŽIVALIH

Vedenjski odziv na svetlobo se zdi v podzemlju nepotrebna lastnost (Langecker, 1992). Fotofobno vedenje jamskih živali naj bi se skozi evolucijo popolnoma reduciralo, podobno kot tudi oči in pigment (Vawter in sod., 1987). Raziskave vedenjskega odziva na svetlobo pri jamskih živalih to domnevo potrjujejo, saj so skoraj vse pokazale regresijo tega vedenja. Čeprav je bilo vedenje jamskih populacij v naši raziskavi raznoliko, so se vse odzvale na svetlobo fotofobno in nikjer ni prišlo do popolne redukcije odziva. Jamski vodni oslički iz Zelških jam in jame Škratovke so bili nasprotno celo izrazito bolj fotofobni kot njihova predniška površinska populacija s Cerkniskega polja. Kolikor nam je znano, je to prvi neposredni primer povečane fotofobnosti jamske populacije nasproti svoji predniški površinski populaciji. V uvodu smo sicer omenili, da so bile jamske populacije pupka *Calotriton asper* bolj fotofobne

kot površinske populacije (Lengvenus in Parzefall, 1992). Ker pa razlike vedenja niso bile statistično značilne in ker njihove jamske populacije praktično niso troglomorfne, to ni dober primer. Povečana fotofobnost verjetno kaže na pomembnost tega vedenja tudi pri jamskih živalih. Ob neodzivnosti na svetlobo bi se lahko znašle zunaj svojega optimalnega okolja (Langecker, 1992; Fišer in sod., 2016).

Regresivno evolucijo je težko pojasniti tako pri morfoloških kot vedenjskih lastnostih živali. Jeffery (2009), ki je raziskoval regresivno evolucijo oči in pigmenta pri ribi *Astyanax mexicanus*, predlaga tri možne razlage za ta pojav. Prvič, naravna selekcija lahko vodi v redukcijo, saj je tvorba oči in pigmentov energetsko potratna, kar pride še posebno do izraza v s hranili revnem podzemeljskem okolju. Druga razlaga pa pripisuje izgubo oči in pigmentov nevtralnimi mutacijam in genetskemu zdrsu ob sproščeni selekciji za te lastnosti v podzemlju. Dosedanje raziskave pri *A. mexicanus* pa kažejo v prid tretje razlage, tj. antagonistične pleiotropije. Pri tej regresiji oči in pigmenta posredno povzroči selekcija za druge lastnosti, ki so z regresivnimi lastnostmi povezane z razvojnimi mehanizmi (Protas in Jeffery, 2012). Kateri od evolucionjskih mehanizmov je v ozadju regresije vedenjskega odziva na svetlobo, ni znano. V primeru opažene povečane fotofobije pa gre najverjetneje za posledico naravne selekcije. Pri tem je vseeno presenetljiva nekonvergentna evolucija tega vedenja ob prilagajanju na podzemlje, saj bi v skladu s teorijo ekološke speciacije pričakovali paralelno evolucijo in konvergenco tega vedenja (Nosil, 2012).



## 5 SKLEPI

1) Vedenjski odziv na svetlobo jamskih in površinskih populacij vodnega oslička je bil fotofoben. Izrazitost fotofobnega vedenja se je pri obeh ekomorfih povečevala z naraščajočo jakostjo svetlobe.

2) Vedenjski odziv vseh površinskih populacij je bil podoben, prazna jakost svetlobe je bila pri vseh  $0,005 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

3) Vedenjski odziv jamskih populacij je bil različen, tudi prazne jakosti svetlobe so bile pri njih različne ( $0,005$ ;  $5$  in  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Evolucija vedenjskega odziva na svetlobo pri jamskih vodnih osličkih je torej nekonvergentna.

4) Variabilnost odziva je bila pri populacijah iz Pivkinega rokava Planinske jame in Krške jame opazno večja kot pri ostalih jamskih in površinskih populacijah. Vzrok temu je pri prvi populaciji verjetno okuženost nekaterih osebkov s paraziti ježerilci, ki lahko spremenijo vedenjski odziv na svetlobo. Pri populaciji iz Krške jame je večja variabilnost morda posledica različne stopnje redukcije oči in pigmentov pri različnih osebkih.

5) Osebki jamske populacije iz Zelških jam so bili pri vseh jakostih svetlobe bolj fotofobni kot osebki predniške površinske populacije s Cerknškega polja. Pri ostalih dveh parih izpeljane jamske in predniške površinske populacije pa je bila jamska populacija pri posamezni jakosti svetlobe manj fotofobna ali pa statistično značilnih razlik v vedenju ni bilo.

6) Razlika vedenjskega odziva na svetlobo med jamskima populacijama iz Zelških jam in jame Škratovke ter njune predniške površinske populacije s Cerknškega polja bi lahko delovala kot reproduktivna bariera in prispevala k speciaciji. Razlike v vedenju ostalih dveh parov izpeljane jamske in predniške površinske populacije ne morejo delovati kot bariera genskemu pretoku.

7) Izrazitejša fotofobnost jamskih populacij iz Zelških jam in jame Škratovke nasproti njuni predniški površinski populaciji s Cerkniskega polja je prvi neposredni dokaz selekcije za povečano fotofobnost ob prilagajanju živali na podzemeljsko okolje.

## 6 POVZETEK

Speciacija je proces nastanka novih vrst in pomeni evolucijo reproduktivne izolacije med razhajajočimi populacijami. Pri ekološki speciaciji nastane reproduktivna izolacija kot stranski produkt divergentne selekcije in prilagajanja populacij zaradi razlik v okoljskih dejavnikih. Zaradi izrazitih okoljskih razlik med površinskimi in podzemeljskimi habitati ter specifičnih prilagoditev jamskih živali, so le-ti zelo primeren modelni sistem za raziskave ekološke speciacije. Najbolj očiten abiotski dejavnik, ki ločuje površje od podzemlja, je svetloba. Kljub temu, da imajo jamske živali reducirane oči in pigment, se večina vrst odziva na svetlobo.

Vedenjski odziv jamskih živali na svetlobo so v preteklosti raziskovali predvsem pri ameriških jamskih ribah, a tudi pri nekaterih dvoživkah in nevretenčarjih. Evolucija tega vedenja ob prilagajanju živali na podzemeljsko okolje kljub temu še vedno ni zadovoljivo pojasnjena. Prav tako ni znano, ali lahko vedenjski odziv na svetlobo predstavlja reproduktivno bariero med jamskimi in površinskimi populacijami in prispeva k nastanku jamskih vrst. Sladkovodni enakonožni rak, vodni osliček *Asellus aquaticus*, je, zaradi večkratnih neodvisnih vselitev v podzemlje in še živečih predniških površinskih populacij, odličen modelni organizem za iskanje odgovorov na podobna ekološka in evolucijska vprašanja.

V naši raziskavi smo primerjali vedenjski odziv na svetlobo vodnih osličkov iz štirih jamskih populacij (Zelške jame, jame Škratovka, Pivkinega rokava Planinske jame, Krške jame) z odzivom treh površinskih populacij (s Cerkniškega polja, Planinskega polja, z Ljubljanskega barja). Izbrane površinske populacije predstavljajo izbranim jamskim populacijam predniške populacije. Vedenjski odziv vseh populacij smo izmerili v temi (kontrolni poskus) in pri petih različnih jakostih svetlobe. Uporabili smo med 19 in 50 osebkov na populacijo. Odziv na svetlobo smo merili pri posameznih osebkih, v petrijevkah, razdeljenih na osvetljeno in zatemnjeno polovico. Podatke smo statistično analizirali s posplošenimi linearnimi mešanimi modeli (GLMM) v programu R.

Vedenjski odziv na svetlobo vseh vodnih osličkov je bil fotofoben, tudi izrazitost odziva se je pri vseh povečevala z naraščajočo jakostjo svetlobe. Jamski populaciji iz Zelških

jam in jame Škratovke sta bili izrazito fotofobni, pražna jakost svetlobe je bila  $0,005 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Nasprotno pa so se vodni oslički iz Pivkinega rokava Planinske jame in Krške jame svetlobi umaknili šele pri najvišjih jakostih svetlobe; pražna jakost je bila pri prvih  $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pri drugih pa  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Pri obeh populacijah je bila opazna tudi večja variabilnost vedenjskega odziva, ki jo pri populaciji iz Pivkinega rokava Planinske jame pripisujemo okuženosti s paraziti ježerilci, pri populaciji iz Krške jame pa je morda posledica različne stopnje redukcije oči in pigmentov pri različnih osebkih. Vse površinske populacije so se odzvale podobno fotofobno, pražna jakost svetlobe je bila pri vseh  $0,005 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Primerjava jamskih populacij s pripadajočo predniško površinsko populacijo je pokazala, da so vodni oslički iz Zelških jam pri vseh jakostih svetlobe bolj fotofobni kot oslički iz Cerknškega polja. Pri ostalih dveh parih populacij so bili vodni oslički iz jamske populacije pri posamezni jakosti svetlobe manj fotofobni ali pa statistično značilnih razlik v vedenju ni bilo.

Razlike vedenjskega odziva na svetlobo med jamskimi in površinskimi populacijami vodnih osličkov pričajo o evlucijski spremembi tega vedenja ob prilagajanju na podzemeljsko okolje. Ker smo zaznali razlike v odzivih med jamskih populacijami in ker nismo zaznali enakih razlik pri vedenju med jamsko in predniško površinsko populacijo, med pari populacij, lahko govorimo o nekonvergentni in neparalelni spremembi tega vedenja. V primeru jamskih populacij iz Zelških jam in jame Škratovke ter njune predniške površinske populacije iz Cerknškega polja bi vedenjski odziv na svetlobo lahko deloval kot reproduktivna bariera med populacijami. Povečana fotofobnost teh dveh jamskih populacij je prvi neposredni dokaz o pozitivni selekciji za to vedenje pri jamskih živalih in nasprotuje dosedanjemu prepričanju, da je vedenjski odziv na svetlobo pri njih podvržen regresivni evoluciji.

## 7 VIRI

- Banta A. M. 1910. A comparison of the reactions of a species of surface isopod with those of a subterranean species, Part II, experiments with mechanical stimulations. *The Journal of Experimental Zoology*, 8, 4: 439–488
- Bates D., Maechler M., Bolker B., Walker S. 2016. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.1-12. <https://cran.r-project.org/web/packages/lme4/index.html> (1. september 2016)
- Bauer A., Trouvé S., Grégoire A., Bollache L., Cézilly F. 2000. Differential influence of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) on the behaviour of native and invader gammarid species. *International Journal for Parasitology*, 30, 14: 1453–1457
- Bethel W. M., Holmes J. C. 1973. Altered Evasive Behavior and Responses to Light in Amphipods Harboring Acanthocephalan Cystacanths. *The Journal of Parasitology*, 59, 6: 945–956
- Borowsky B. 2011. Responses to Light in Two Eyeless Cave Dwelling Amphipods (*Niphargus ictus* and *Niphargus frasassianus*). *Journal of Crustacean Biology*, 31, 4: 613–616
- Boughman J. W. 2001. Divergent sexual selection enhances reproductive isolation in sticklebacks. *Nature*, 411, 6840: 944–948
- Bouskill N. J., Handy R. D., Ford T. E., Galloway T. S. 2006. Differentiating copper and arsenic toxicity using biochemical biomarkers in *Asellus aquaticus* and *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, 3: 342–349
- Bratley J. 1986. Life history and population biology of larval *Acanthocephalus lucii* (Acanthocephala: Echinorhynchidae) in the isopod *Asellus aquaticus*. *The Journal of parasitology*, 633–645
- Burchards H., Dölle A., Parzefall J. 1985. Aggressive behaviour of an epigeal population of *Astyanax mexicanus* (Characidae, Pisces) and some observations of three subterranean populations. *Behavioural processes*, 11, 3: 225–235
- Canty A., Ripley B. 2016. boot: Bootstrap R (S-Plus) Functions. R package version 1.3-18 <https://cran.r-project.org/web/packages/boot/index.html> (1. september 2016)
- Cézilly F., Grégoire A., Bertin A. 2000. Conflict between co-occurring manipulative parasites? An experimental study of the joint influence of two acanthocephalan parasites on the behaviour of *Gammarus pulex*. *Parasitology*, 120, 6: 625–630
- Cooper S. J. B., Hinze S., Leys R., Watts C. H. S., Humphreys W. F. 2002. Islands under the desert: molecular systematics and evolutionary origins of stygobitic water

- beetles (Coleoptera: Dytiscidae) from central Western Australia. *Invertebrate Systematics*, 16, 4: 589-590
- Coyne J.A. 1992. Genetics and speciation. *Nature*, 355, 6360: 511–515
- Coyne J. A., Orr H. A. 1997. Patterns of speciation in *Drosophila*: revisited. *Evolution*, 51: 295–303
- Coyne J. A., Orr H. A. 1998. The evolutionary genetics of speciation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*, 353, 1366: 287–305
- Coyne J. A., Orr H. A. 2004. *Speciation*. Sunderland, Sinauer Associates: 545 str.
- Christiansen K. 1962. Proposition pour la classification des animaux cavernicoles. *Spelunca*, 2: 75–8
- Cruz R., Carballo M., Conde-Padin P., Rolan-Alvarez E. 2004. Testing alternative models for sexual isolation in natural populations of *Littorina saxatilis*: indirect support for by-product ecological speciation? *Journal of Evolutionary Biology*. 17: 288–293
- Culver D. C., Kane T. C., Fong D. W. 1995. *Adaptation and Natural Selection in Caves: The Evolution of Gammarus minus*. London, Harvard University Press: 240 str.
- Culver D. C., Pipan T. 2009. *The Biology of Caves and Other Subterranean Habitats*. New York, Oxford University Press: 256 str.
- Darwin C. 1859. *On the origin of species*. London, John Murray: 502 str.
- Davison A. C., Hinkley D. V. 1997. *Bootstrap Methods and Their Applications*. Cambridge, Cambridge University Press: 594 str.
- De Lange H. J., Sperber V., Peeters E. T. H. M. 2006. Avoidance of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon–Contaminated Sediments by the Freshwater Invertebrates *Gammarus Pulex* and *Asellus Aquaticus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 2: 452–457
- Fišer Ž., Novak L., Luštrik R., Fišer C. 2016. Light triggers habitat choice of eyeless subterranean but not of eyed surface amphipods. *The Science of Nature*, 103, 1-2: 7, doi:10.1007/s00114-015-1329-9: 12 str.
- Friedrich M., Chen R., Daines B., Bao R., Caravas J., Rai P. K., Zagnajster M., Peck S. B. 2011. Phototransduction and clock gene expression in the troglobiont beetle *Ptomaphagus hirtus* of Mammoth cave. *Journal of Experimental Biology*, 214, 21: 3532–3541

- Grant B. R., Grant P. R. 1979. Darwin's finches: Population variation and sympatric speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 5: 2359–2363
- Grant B. R., Grant P. R. 2003. What Darwin's Finches Can Teach Us about the Evolutionary Origin and Regulation of Biodiversity. *BioScience*, 53, 10: 965–975
- Green S. M., Romero A. 1997. Responses to light in two blind cave fishes (*Amblyopsis spelaea* and *Typhlichthys subterraneus*) (Pisces: Amblyopsidae). *Environmental Biology of Fishes*, 50, 2: 167–174
- Harper F. M., Hart M. W. 2005. Gamete compatibility and sperm competition affect paternity and hybridization between sympatric *Asterias* sea stars. *The Biological bulletin*, 209, 2: 113–126
- Hasu T., Jokela J., Valtonen E. T. 2008. Effects of growth factors and water source on laboratory cultures of a northern *Asellus aquaticus* (Isopoda) population. *Aquatic Ecology*, 42, 1: 141–150
- Hothorn T., Bretz F., Westfall P. 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, 50, 3: 346–363
- Hothorn T., Bretz F., Westfall P., Heiberger R. M., Schuetzenmeister A., Scheibe S. 2016. multcomp: Simultaneous Inference in General parametric models. R package version 1.4-6.  
<https://cran.r-project.org/web/packages/multcomp/index.html> (1. september 2016)
- Janzer W., Ludwig W. 1952. Versuche Zur Evolutorischen Entstehung Der Hohlentiermerkmale. *Zeitschrift fur indukt. Abstammungs und Vererbungslehre*, 84, 462–479
- Jeffery W.R. 2009. Regressive evolution in *Astyanax* cavefish. *Annual review of genetics*, 43: 25–47
- Jiggins C. D. 2008. Ecological Speciation in Mimetic Butterflies. *BioScience*, 58, 6: 541–548
- Kelley J. L., Passow C. N., Plath M., Arias Rodriguez L., Yee M., Tobler M. 2012. Genomic resources for a model in adaptation and speciation research: characterization of the *Poecilia mexicana* transcriptome. *BMC Genomics*, 13, 1: 652, doi: 10.1186/1471-2164-13-652: 13 str.
- Konec M. 2015. Genetska diferenciacija in speciacija podzemeljskih in površinskih populacij vodnega oslička *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). Doktorska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 87 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
- Langecker T. G. 1992. Light Sensitivity of Cave Vertebrates. Behavioral and Morphological Aspect. V: *The Natural History of Biospeleology*. Camacho A. I. (ur.). Madrid, Consejo superior de investigaciones científicas: 295–326
- Lengvenus W., Parzefall J. 1992. The role of the visual reaction in the behaviour of an epigeal and a cave living population of *Euproctus asper* Duges (Salamandridae, Urodela). *Mémoires de Biospéléologie*, 19: 111–115
- Lozej N. 2016. Razlike v izbiri podlage in iskanju zatočišč med površinskimi in podzemeljskimi vodnimi oslički. Magistrska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 48 str.
- Manenti R., Denoël M., Ficetola G. F. 2013. Foraging plasticity favours adaptation to new habitats in fire salamanders. *Animal Behaviour*, 86, 2: 375–382
- Marshall J., Kent J., Cronin T. 1999. Visual adaptations in crustaceans: Spectral sensitivity in diverse habitats. V: *Adaptive Mechanisms in the Ecology of Vision*. Archer S. N., Djamgoz M. B. A., Loew E. R., Partridge J. C., Vallerga, S. (ur.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 285–327
- Mayr E. 1942. *Systematics and the Origin of Species*. New York, Columbia University Press: 372 str.
- Mayr E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press: 811 str.
- Mayr E. 1995. Species, classification, and evolution. V: *Biodiversity and Evolution*. Arai R., Kato M., Doi Y. (ur.). Tokyo, National Science Museum Foundation: 3-12
- McKinnon J. S., Seiichi M., Blackman, B. K., Lior D., Kingsley D. M., Jamieson L., Chou J., Schluter D. 2004. Evidence for ecology's role in speciation. *Nature*, 429, 6989: 294–298
- Mösslacher F., Creuze Des Chatelliers M. 1996. Physiological and behavioural adaptations of an epigeal and a hypogean dwelling population of *Asellus aquaticus* (L.) (Crustacea, Isopoda). *Archiv für Hydrobiologie*, 138, 2: 187–198
- Nosil P., Vines T. H., Funk D. J. 2005. Reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats. *Evolution*, 59, 4: 705-719



- Nosil P. 2007. Divergent host plant adaptation and reproductive isolation between ecotypes of *Timema cristinae* walking sticks. *The American naturalist*, 169, 2: 151–62
- Nosil P. 2012. *Ecological speciation*. Oxford, Oxford University Press: 304 str.
- Novak L. 2014. Vpliv svetlobe na distribucijo podzemeljskih in površinskih postranic. Magistrska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 54 str.
- Parzefall J. 1996. Behavioural and morphological changes caused by light conditions in deep-sea and shallow-water habitats. V: *Deep-sea and extreme shallow-water habitats: affinities and adaptations*. Biosystematics and Ecology Series 11. Uiblein F., Stachowitsch M. (ur.). Wien, Österreichische Akademie der Wissenschaften: 91-122
- Parzefall J. 2012. Behavioral Adaptations. V: *Encyclopedia of Caves*. White W. B., Culver D. C. (ur.). Waltham, Academic Press: 62–70
- Parzefall J., Kraus C., Tobler M., Plath M. 2007. Photophilic behaviour in surface- and cave- dwelling Atlantic mollies *Poecilia mexicana* (Poeciliidae). *Journal of Fish Biology*, 71, 4: 1225–1231
- Pickles A. R., Grahame J. 1999. Mate choice in divergent morphs of the gastropod mollusc *Littorina saxatilis* (Oliv): speciation in action? *Animal Behaviour*, 58, 1: 181-184
- Pipan T., Culver D. C. 2012. Convergence and divergence in the subterranean realm: A reassessment. *Biological Journal of the Linnean Society*, 107, 1: 1–14
- Plath M., Heubel K. U., De León F. J. G., Schlupp I. 2005. Cave molly females (*Poecilia mexicana*, Poeciliidae, Teleostei) like well-fed males. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 58, 2: 144–151
- Poulson T. L., White W. B. 1969. The cave environment. *Science*, 165, 3897: 971–81
- Prevorčnik S., Blejec A., Sket B. 2004. Racial differentiation in *Asellus aquaticus* (L.) (Crustacea: Isopoda: Asellidae). *Archiv für Hydrobiologie*, 160, 2: 193–214
- Prevorčnik S., Jugovic J., Sket B. 2009. Geography of morphological differentiation in *Asellus aquaticus* (crustacea: Isopoda: Asellidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 47, 2: 124–131
- Protas M. E., Jeffery W. R. 2012. Evolution and development in cave animals: from fish to crustaceans. *Wiley interdisciplinary reviews, Developmental biology*, 1, 6: 823–45

- Protas M. E., 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 of the United States of America, 108, 14: 5702–5707
- Riesch R., Plath M., Schlupp I., 2011. Speciation in caves: experimental evidence that permanent darkness promotes reproductive isolation. Biology Letters, 7, 909–912
- Romero A. 1985. Ontogenetic Change in Phototactic Responses of Surface and Cave Populations of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characidae). Copeia, 1985, 4: 1004–1011
- Rundle H. D., Boughman J. W. 2010. Behavioural Ecology and Speciation. V: Evolutionary Behavioral Ecology. Westneat D. F., Fox C. W. (ur.). Oxford: Oxford University Press: 471–487
- Rundle H. D., Nosil P. 2005. Ecological speciation. Ecology Letters, 8, 3: 336–352
- Schluter D., Rambaut A. 1996. Ecological speciation in postglacial fishes [and discussion]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 351, 1341: 807-814
- 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, 5915: 737–741
- Shettleworth S. 2010. Cognition, evolution, and behavior. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Oxford University Press: 700 str.
- Simčič T., Brancelj A. 2007. The effect of light on oxygen consumption in two amphipod crustaceans—the hypogean *Niphargus stygius* and the epigeal *Gammarus fossarum*. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 40, 2: 141–150
- 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, 1: 39–47
- Smadja C., Butlin R. K. 2009. On the scent of speciation: the chemosensory system and its role in premating isolation. Heredity, 102, 1: 77–97
- Spicer J. I. 1998. Is the reduced metabolism of hypogean amphipods solely a result of food limitation? Hydrobiologia, 37, 1/3: 201–204
- Stahl B. A., Gross J. B., Speiser D. I., Oakley T. H., Patel N. H., Gould D. B., Protas M. E. 2015. A transcriptomic analysis of cave, surface, and hybrid isopod crustaceans

of the species *Asellus aquaticus*. PLoS ONE, 10, 10: 1–14, doi: dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0140484: 14 str.

- Steinfartz S., Schlegel P., Bulog B. 2009. Non-visual sensory physiology and magnetic orientation in the Blind Cave Salamander, *Proteus anguinus* (and some other cave-dwelling urodele species). Review and new results on light-sensitivity and non-visual orientation in subterranean urodeles (Amphibia). *Animal Biology*, 59, 3: 351–384
- Tobler M., 2009. Does a predatory insect contribute to the divergence between cave- and surface-adapted fish populations? *Biology Letters*, 5, 4: 506–509
- Tonnis B., Grant P. R., Grant B. R., Petren K. 2005. Habitat selection and ecological speciation in Galápagos warbler finches (*Certhidea olivacea* and *Certhidea fusca*). *Proceedings of the Royal Society: Biological sciences*, 272, 1565: 819–26
- Thorpe R. S., Surget-Groba Y., Johansson H. 2010. Genetic tests for ecological and allopatric speciation in anoles on an island archipelago. *PLoS Genetics*. 6, 4: e1000929, doi: dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000929: 12 str.
- Trontelj P., Blejec A., Fišer C. 2012. Ecomorphological convergence of cave communities. *Evolution*, 66, 12: 3852–3865
- Trontelj P. 2012. Natural selection. V: *Encyclopedia of Caves*. White W. B., Culver D. C. (ur.). Chennai, Academic Press: 543–549
- Turelli M., Barton N.vH., Coyne J. A. 2001. Theory and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 7: 330–343
- Turk S., Sket B., Sarbu S. 1996. Comparison between some epigeal and hypogean populations of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae). *Hydrobiologia*, 337, 1-3: 161–170
- Vawter A. T., Fong W. D., Culver C. D. 1987. Negative phototaxis in surface and cave populations of the Amphipod *Gammarus minus*. *Stygologia*, 3, 1: 83–88
- Vamosi S. M., Schluter D. 2002. Impacts of trout predation on fitness of sympatric sticklebacks and their hybrids. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 269, 1494: 923–930
- Verovnik R., Sket B., Prevorčnik S., Trontelj P. 2003. Random amplified polymorphic DNA diversity among surface and subterranean populations of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Genetica*, 119, 2: 155–165
- Verovnik R., Sket B., Trontelj P. 2004. Phylogeography of subterranean and surface populations of water lice *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Molecular Ecology*, 13, 6: 1519–1532

Verovnik R., Sket B., Trontelj P. 2005. The colonization of Europe by the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) proceeded from ancient refugia and was directed by habitat connectivity. *Molecular ecology*, 14, 14: 4355–4369

Verovnik R. 2012. *Asellus aquaticus*: A model system for historical biogeography. V: *Encyclopedia of Caves*. White W. B., Culver D. C. (ur.). Chennai, Academic Press. 30–36

Webster S. E., Galindo J., Grahame J. W., Butlin R. K. 2012. Habitat choice and speciation. *International Journal of Ecology*, 2012, doi: [dx.doi.org/10.1155/2012/154686](https://doi.org/10.1155/2012/154686): 12 str.

Wickham H. 2009. *ggplot2: Elegant Graphic for Data Analysis*. 1<sup>st</sup> ed. New York, Springer: 213 str.

Wood T. K., Keese M. C. 1990. Host-plant-induced assortative mating in *Enchenopa* treehoppers. *Evolution*: 619-628

## ZAHVALA

Hvala mentorju profesorju dr. Petru Trontlju za vodenje in usmerjanje pri raziskovlanem delu.

Hvala Žigi Fišerju za vso pomoč pri nabiranju vodnih osličkov, izvedbi poskusov, statistični analizi in pisanju naloge ter hvala Žigi in Luki Novaku za vse pogovore, ki so v začetku poglobili moje zanimanje in obogatili raziskovalno delo.

Hvala vsem članom komisije za hiter, a temeljit pregled in organizacijo zagovora.

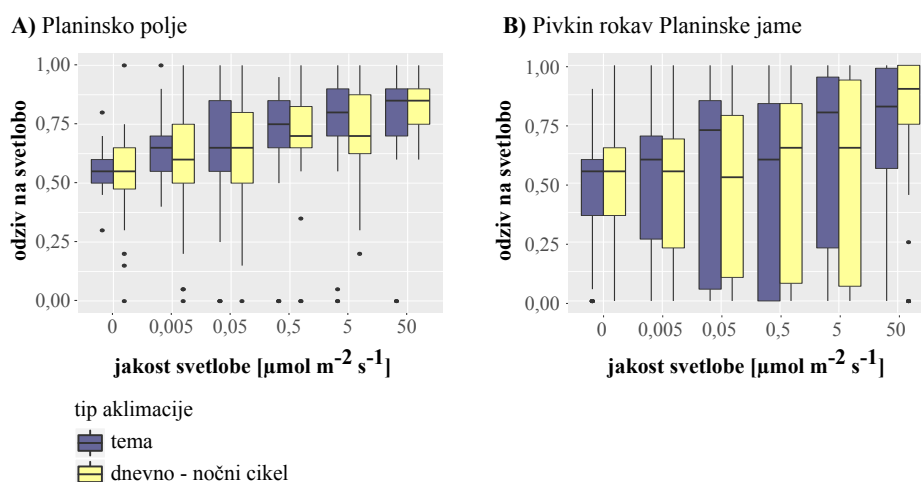
Hvala prijateljicam, prijateljem in družini za vse spodbude v zadnjih letih.

In predvsem, hvala vsem za potrpežljivost. Ostane le še »zbogom in hvala za vse ribe«, ekhm, vodne osličke.

## PRILOGA A

### **Vpliv tipa aklimacije na vedenjski odziv na svetlobo površinskih in jamskih vodnih osličkov *Asellus aquaticus***

Površinske vodne osličke iz Planinskega polja in jamske vodne osličke iz Pivkinega rokava Planinske jame smo razdelili v dve skupini po 40 oziroma 50 osebkov. Eno skupino smo aklimirali na dnevno-nočnem ciklu (12 h – 12 h), drugo pa v temi. Aklimacija je potekala en teden pri 10 °C. Pri aklimaciji na dnevno-nočni cikel smo za vir svetlobe uporabili 18 W fluorescentno sijalko (Osram FD T26 L 18W-954 G13 Daylight), ki posnema spekter naravne svetlobe; jakost svetlobe je med aklimacijo znašala 15  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Meritve vedenjskega odziva na svetlobo smo izvedli, kot je opisano v poglavju Materiali in metode. Podatke smo analizirali s tretjim tipom modela (M3, glej poglavje Analiza podatkov), pri čemer smo neodvisno spremenljivko ekomorf nadomestili z neodvisno spremenljivko tip aklimacije (dnevno-nočni, tema). Pri površinski populaciji tip aklimacije ni vplival na odziv na svetlobo pri nobeni jakosti svetlobe (Slika A1-A, Preglednica A1). Prav tako ni vplival na odziv pri jamski populaciji pri štirih jakostih svetlobe (Slika A1-B, Preglednica A1), le pri najvišji (50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) smo ugotovili statistično značilno razliko v odzivu. Ker je p-vrednost le malo pod izbrano prazno vrednostjo statistične značilnosti ( $\alpha = 0.05$ ), vse ostale razlike pa niso statistično značilne, slednji ne pripisujemo velikega pomena.



Slika A1: Vpliva tipa aklimacije na vedenjski odziv na svetlobo površinske (Planinsko polje) in jamske (Pivkin rokav Planinske jame) populacije vodnih osličkov. Vrednost 0,5 pri odzivu na svetlobo pomeni fotonevtralen odziv, vrednosti med 0 in 0,5 predstavljajo fotofilno vedenje, vrednosti med 0,5 in 1 pa fotofobno vedenje. Razmiki med kategorijami jakosti svetlobe so predstavljeni kot na logaritemski skali.

Preglednica A1: Vpliv tipa aklimacije na vedenjski odziv na svetlobo pri površinski (Planinsko polje) in jamski (Pivkin rokav Planinske jame) populaciji vodnih osličkov. DN – aklimacija na dnevno-nočni cikel; T – aklimacija v temi; DN-T – razlika med obema tipoma aklimacije. Ocene parametrov in pripadajoči 95-odstotni intervali zaupanja so podani na logit skali. Negativna vrednost ocene parametra za DN-T pomeni bolj fotofoben odziv pri aklimaciji v temi; pozitivna vrednost pa bolj fotofoben odziv pri aklimaciji na dnevno-nočni cikel.

populacija	aklimacija	jakost svetlobe [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	ocena parametra [95 % IZ]	p - vrednost
Planinsko polje	DN	0	0,21 [- 0,12; 0,54]	0,34
	T	0	0,13 [- 0,18; 0,45]	0,80
	DN-T	0,005	0,19 [- 0,27; 0,66]	0,80
	DN-T	0,05	0,07 [- 0,40; 0,53]	> 0,99
	DN-T	0,5	- 0,05 [- 0,53; 0,42]	> 0,99
	DN-T	5	0,05 [- 0,43; 0,52]	> 0,99
	DN-T	50	- 0,44 [- 0,95; 0,07]	0,13
Pivkin rokav Planinske jame	DN	0	- 0,28 [- 0,70; 0,14]	0,29
	T	0	0,07 [- 0,35; 0,50]	0,99
	DN-T	0,005	- 0,002 [- 0,60; 0,59]	> 0,99
	DN-T	0,05	0,16 [- 0,43; 0,76]	0,92
	DN-T	0,5	- 0,38 [- 0,97; 0,22]	0,34
	DN-T	5	0,26 [- 0,34; 0,85]	0,68
	DN-T	50	- 0,63 [- 1,24; - 0,01]	<b>0,04</b>