

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Žiga FIŠER

**ZNOTRAJVRSTNA RAZNOLIKOST ITRSKE
SLEPE POSTRANICE *NIPHARGUS KRAMERI***

Diplomsko delo
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Žiga FIŠER

**ZNOTRAJVRSTNA RAZNOLIKOST ISTRSKE SLEPE
POSTRANICE *NIPHARGUS KRAMERI***

Diplomsko delo
Univerzitetni študij

**INTRASPECIFIC DIVERSITY OF THE ISTRIAN BLIND AMPHIPOD
*NIPHARGUS KRAMERI***

Graduation Thesis
University Studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko naložbo sem opravljal na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomske naloge imenovala doc. dr. Ceneta Fišerja in za somentorico dr. Valerijo Zakšek.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Simona Prevorčnik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Boris Sket, recenzent

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Cene Fišer, mentor

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: dr. Valerija Zakšek, somentor

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 29. 6. 2011

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Žiga Fišer

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du1

DK 591.9:591.4:595.371(043.2)=163.6

KG postranice / *Niphargus krameri* / Istra / filogenija / filogeografija / taksonomija

AV FIŠER, Žiga

SA FIŠER, Cene

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2011

IN ZNOTRAJVRSTNA RAZNOLIKOST ISTRSKE SLEPE POSTRANICE
NIPHARGUS KRAMERI

TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)

OP vi, 33 str., 1 pregl., 12 sl., 3 pril., 46 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI V podzemnih in površinskih vodah Istre živi istrska slepa postranica *Niphargus krameri* Schellenberg. Kljub temu, da je bilo v preteklosti v taksonomske raziskave teh živali vloženega že veliko dela, so nedavno opisali tri geografsko dobro ločene morfološke rase. Z namenom preveriti ali obstajajo razlike tudi na molekulski ravni, smo analizirali zaporedja 28S rRNA in COI 42 osebkov iz 23 lokalitet ter zaporedja ITS 5 osebkov iz 5 lokalitet. Filogenetske analize so pokazale, da je *N. krameri* monofiletska skupina znotraj katere obstajata dva dobro ločena klada. Klad A združuje populacije v pazinskem flišnem bazenu, ki morfološko ustrezajo pazinski rasi. Klad B sestavlja populacije iz zaledja Tržaškega zaliva, Slovenskega Primorja, Čičarije in južnega obrobja pazinskega flišnega bazena, ki morfološko ustrezajo tržaški in čičarijski rasi. Ujemanje molekulskih in morfoloških podatkov priča o izoliranosti genskih skladov obeh skupin populacij *N. krameri*. Predlagamo, da se *N. krameri* obravnava kot kompleks dveh vrst, od katerih je treba eno na novo formalno opisati.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND Du1

DC 591.9:591.4:595.371(043.2)=163.6

CX amphipods / *Niphargus krameri* / Istria / phylogeny / phylogeography / taxonomy

AU FIŠER, Žiga

AA FIŠER, Cene

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2011

TI INTRASPECIFIC DIVERSITY OF THE ISTRIAN BLIND AMPHIPOD
NIPHARGUS KRAMERI

DT Graduation Thesis (University studies)

NO vi, 33 p., 1 tab., 12 fig., 3 ann., 46 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Subterranean and surface waters of the Istra peninsula are inhabited by the Istrian blind amphipod *Niphargus krameri* Schellenberg. Despite the large amount of work in the taxonomic research of these animals in the past, three geographically well delimited morphological ‘races’ have been described recently. In order to examine whether there are any differences present on the molecular level as well, 28S rRNA and COI sequences of 42 specimens from 23 localities and ITS sequences of 5 specimens from 5 localities were analysed. Phylogenetic analyses confirmed the monophyletic status of *N. krameri* and revealed a clear separation of the group into two clades. Clade A consists of populations from the Pazin flysch basin that morphologically correspond to the pazin race. Clade B on the other hand unites populations from the hinterland of the Trieste Gulf, Slovensko Primorje, Čičarija and the southern margins of the Pazin flysch basin that morphologically correspond to the trieste and čičarija races. The agreement between molecular and morphological data speaks for the isolation of the gene pools of both groups of populations of *N. krameri*. We propose that *N. krameri* is treated as a complex of two species, one of which needs a new formal description.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	iii
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	iv
KAZALO VSEBINE.....	v
KAZALO TABEL.....	v
KAZALO SLIK.....	vi
KAZALO PRILOG	vi
1 UVOD	1
1.1 ROD <i>NIPHARGUS</i> IN TAKSONOMSKA PROBLEMATIKA.....	1
1.2 SPLOŠNI KONCEPT VRSTE.....	2
1.3 <i>NIPHARGUS KRAMERI</i> KOT PRIMER TAKSONOMSKEGA PROBLEMA	3
2 MATERIALI IN METODE	6
2.1 MATERIALI	6
2.2 METODE.....	7
2.2.1 PREGLED VZORCEV IN MORFOLOGIJE IZBRANIH <i>N. KRAMERI</i>	7
2.2.2 IZOLACIJA DNA	7
2.2.3 POMNOŽEVANJE DNA V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO (PCR)....	7
2.2.4 ČIŠČENJE PRODUKTov PCR.....	9
2.2.5 DOLOČANJE IN ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ	10
2.2.6 FILOGENETSKE ANALIZE	11
3 REZULTATI.....	13
3.1 FILOGENETSKA DREVESA.....	13
3.2 PATRISTIČNE GENETSKE RAZDALJE.....	20
3.3 FILOGEOGRAFSKA OBRAVNAVA	21
4 RAZPRAVA.....	22
4.1 TAKSONOMSKA OBRAVNAVA	22
4.2 SCENARIJI SPECIACIJE ZNOTRAJ KOMPLEKSA <i>N. KRAMERI</i>	23
5 SKLEPI	27
6 POVZETEK	28
7 VIRI	29
ZAHVALA	
KAZALO TABEL	

Tabela 1: Povprečne patristične razdalje znotraj in med kladoma A in B vrste *Niphargus krameri*, izračunane iz drevesa največjega verjetja za gen COI.....20

KAZALO SLIK

Slika 1: Vzorec ščetin na karpalnem členu prvega (GI/5) in drugega (GII/5) gnatopoda pri osebku pazinske rase <i>Niphargus krameri</i>	4
Slika 2: Razširjenost pazinske, tržaške in čičarijske morfološke rase <i>Niphargus krameri</i> ...	5
Slika 3: Prikaz lokalitet in pripadnosti morfološki rasi molekulsko analiziranih osebkov <i>Niphargus krameri</i>	6
Slika 4: Drevo filogenetskih odnosov med osebki različnih populacij <i>Niphargus krameri</i> na podlagi gena za 28S rRNA po metodi največjega verjetja.....	14
Slika 5: Drevo filogenetskih odnosov med osebki različnih populacij <i>Niphargus krameri</i> na podlagi gena za 28S rRNA po Bayesovi metodi.....	15
Slika 6: Drevo filogenetskih odnosov med osebki različnih populacij <i>Niphargus krameri</i> na podlagi gena za COI po metodi največjega verjetja.....	16
Slika 7: Drevo filogenetskih odnosov med osebki različnih populacij <i>Niphargus krameri</i> na podlagi gena za COI po Bayesovi metodi.....	17
Slika 8: Drevo filogenetskih odnosov med osebki različnih populacij <i>Niphargus krameri</i> na podlagi združenih genov za 28S rRNA in COI po metodi največjega verjetja.....	18
Slika 9: Drevo filogenetskih odnosov med osebki različnih populacij <i>Niphargus krameri</i> na podlagi združenih genov za 28S rRNA in COI po Bayesovi metodi.....	19
Slika 10: Drevo filogenetskih odnosov med osebki različnih populacij <i>Niphargus krameri</i> na podlagi gena ITS po metodi največjega verjetja in po Bayesovi metodi.....	20
Slika 11: Lokalitete molekulsko analiziranih osebkov klada A in klada B <i>Niphargus krameri</i> (a) in z ekstrapolacijo molekulske analize na morfološke podatke predvidena razširjenost klada A in klada B <i>Niphargus krameri</i> (b).....	21
Slika 12: Razširjenost vrste <i>Niphargus spinulifemur</i> se prekriva s kladom A in kladom B <i>Niphargus krameri</i>	25

KAZALO PRILOG

PRILOGA A Seznam lokalitet molekulsko analiziranih osebkov *Niphargus krameri*.

PRILOGA B Seznam nukleotidnih zaporedij vrst rodu *Niphargus*, ki so bile vključene v filogenetske analize kot zunanjiki.

PRILOGA C Seznam analiziranih osebkov *Niphargus krameri* po pripadnosti morfološki rasi in molekulskemu kladu.

1 UVOD

1.1 ROD NIPHARGUS IN TAKSONOMSKA PROBLEMATIKA

Rod *Niphargus* Schiödte 1847 (Crustacea: Amphipoda) je, z več kot 300 opisanimi vrstami in podvrstami, največji rod sladkovodnih postranic (Väinölä in sod. 2008). Večina vrst naseljuje podzemne vode in predstavlja pomemben del biološke raznovrstnosti evropskih podtalnih voda (Sket 1999a,b). Razširjenost rodu zajema dele Evrope (brez Pirenejskega polotoka), ki so med pleistocenskimi poledenitvami večinoma ostali južno od ledenega pokrova (Ruffo 1953; Karaman & Ruffo 1986; Proudlove in sod. 2003). Nekaj vrst je poznanih tudi iz Arabskega polotoka, Turčije in Irana (Karaman 1986, 1998; Bat in sod. 2001).

Različne vrste žive v vseh tipih podzemnih voda (intersticialnih vodah, jamskih potokih, rekah in jezerih, sistemih špranj v epikrasu, izvirih, somornih, mineralnih in termalnih vodah), nekaj vrst pa naseljuje tudi površinske vode (manjše potoke, gozdne jarke in rastišča šotnega mahu *Sphagnum*) (Sket 1999a). Velika pestrost življenjskih prostorov se ujema z izjemno morfološko raznolikostjo znotraj rodu *Niphargus* (Karaman & Ruffo 1986; Sket 1999a). Rezultati molekulskih raziskav filogenetskih odnosov znotraj rodu kažejo, da so morfološki znaki v veliki meri homoplastični in da so razlike na molekulski ravni pogosto večje kot kaže morfologija (Lefébure in sod. 2006a, 2007; Mathieu in sod. 1997). Ta odkritja postavljajo pod vprašaj taksonomijo, ki temelji na morfoloških metodah in razkrivajo dodatno, do nedavnega neopaženo raznolikost. Zaradi izoliranosti podzemnih vodnih habitatov in slabe sposobnosti razširjanja podzemne vodne makrofavne je ta razumljiva. Molekulske analize so pokazale, da so nekatere formalno priznane in morfološko homogene vrste z velikimi areali (*N. virei* Chevreux, *N. rhenorhodanensis* Schellenberg, *N. tatrensis* Wrześniowsky, ...) v resnici kompleksi, sestavljeni iz ločenih filogenetskih linij, med katerimi ni genskega pretoka. Raziskovalci jih označujejo kot kriptične vrste in ugotavljajo njihovo ozko endemnost, saj so območja njihove razširjenosti le redko večja od 200 km (Trontelj in sod. 2009). Pričakovati smemo, da znotraj rodu obstaja veliko število kriptičnih vrst ali pa so formalne vrste morfološko slabo proučene in so bili nekateri morfološki znaki v preteklosti spregledani.

1.2 SPLOŠNI KONCEPT VRSTE

Vprašanje vrste je eno najstarejših in najpomembnejših vprašanj v biologiji okoli katerega je bilo izrečenih že mnogo besed, ki pa so večinoma le poglabljale nestrinjanje med različnimi tabori biologov. V veliki meri je k temu pripomoglo dejstvo, da obstaja več kot 22 različnih konceptov vrste (Mayden 1997), ki se med seboj izključujejo. Tako pri taksonomskem vrednotenju neke skupine organizmov z upoštevanjem različnih konceptov dobimo različno število vrst, ki povrh vsega niso primerljive, ker so bile izbrane po različnih kriterijih. Uporaba različnih konceptov vrste lahko v ekoloških in biodiverzitetnih raziskavah onemogoči ali vsaj močno oteži primerjavo s sorodnimi raziskavami.

V zadnjem času so de Queiroz, Mayden in drugi storili pomembne premike v razumevanju vrste in ključne korake k poenotenuju koncepta vrste (de Queiroz 2005a; Mayden 1997). De Queiroz je zasnoval splošni koncept vrste (general species concept), ki temelji na osnovni in presečni lastnosti vseh modernih različic koncepta vrste. Na ta način nobenega obstoječega koncepta ne izloči ampak prav nasprotno vse zaobjame v enem, enotnem in splošnem konceptu.

Vsi koncepti eksplisitno ali implicitno enačijo vrste s pokolenji (razvojnimi linijami) metapopulacij (metapopulation lineages), ki evoluirajo ločeno od drugih takšnih pokolenj. Pri tem metapopulacija predstavlja populacijo, ki vsebuje vse podpopulacije, pokolenje pa je populacija gledana skozi daljše časovno obdobje oziroma serije nasledstva prednikov s potomci. To je edini potrebni in hkrati zadostni pogoj, da neko skupino organizmov obravnavamo kot samostojno vrsto. Različni potrebni pogoji (prava reproduktivna izolacija, zasedanje unikatne ekološke niše, monofilija, ustaljeni morfološki znaki, ...), ki so poleg osnovnega vpleteni v definicije množice alternativnih konceptov vrste, so iz te perspektive le drugotne lastnosti, ki jih je vrsta tekom svojega razvoja pridobila ali pa tudi ne. Torej so to lastnosti po katerih prepoznamo ločena pokolenja oziroma vrste in nam služijo kot kazalci speciacije.

Po splošnem konceptu vrste ta ni več samo še ena umetna taksonomska kategorija (rod, družina, red, ...) ampak realna in osnovna biološka entiteta, primerljiva z organizmom in celico kot entitetama nižjih ravni biološke organizacije. Ima svoje koherentne lastnosti in sodeluje v značilnih procesih, zato je za proučevanje obojih nujno poznati pravo vrsto

(realno entiteto) in ne skupine organizmov z določenimi lastnostmi (umetne kategorije) (de Queiroz 2005a,b).

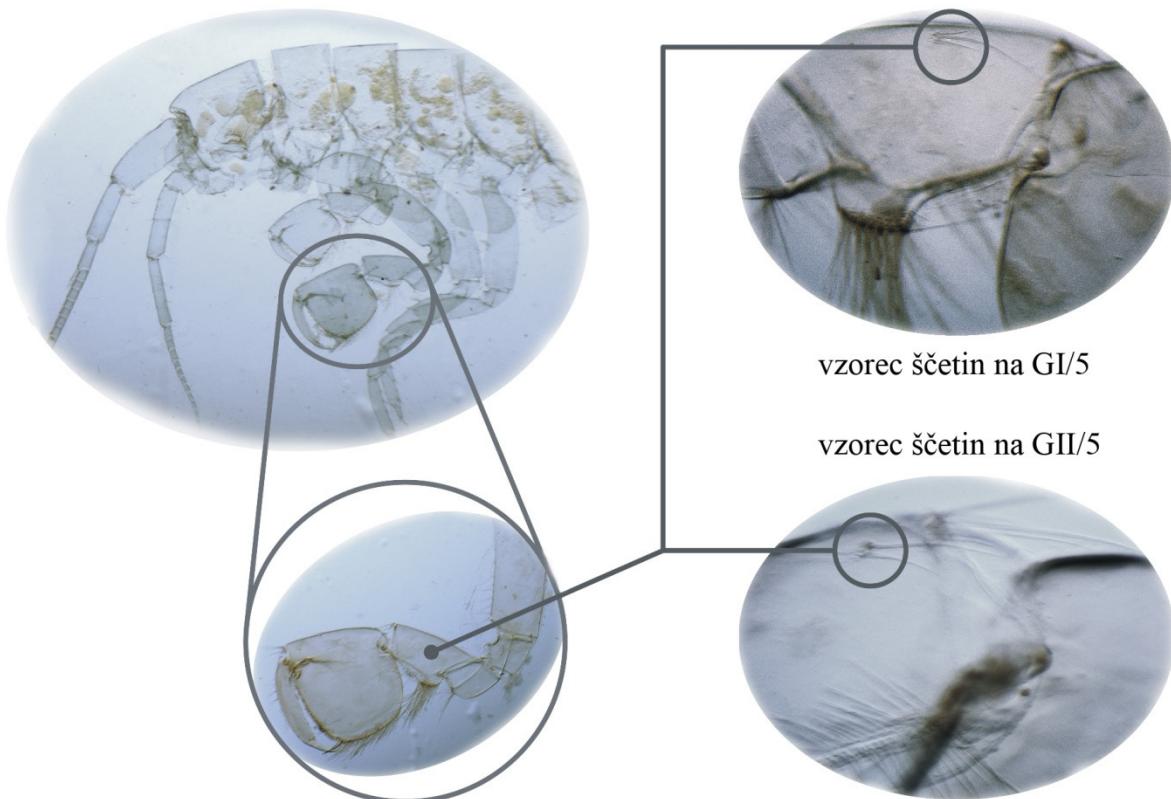
Ne glede na to, je prepoznavanje vrst v praksi težavno in, zaradi nedodelane metodologije, pogosto subjektivno. V sodobni taksonomiji se zato vedno bolj poudarja uporabo prave znanstvene metode, ki vključuje postavitev in testiranje hipoteze (Sites & Crandall 1997). Na podlagi pridobljenih lastnosti neke skupine organizmov, z ustreznimi metodami in v skladu z objektivnimi kriteriji, testiramo ali obravnavamo ločena pokolenja ali ne. Vrsta je potemtakem tudi naša hipoteza o določeni skupini organizmov in je, kot vsaka znanstvena hipoteza, podvržena ponovnemu vrednotenju.

1.3 NIPHARGUS KRAMERI KOT PRIMER TAKSONOMSKEGA PROBLEMA

Taksonomske raziskave istrskih postranic iz kompleksa *Niphargus krameri* Schellenberg imajo že dolgo zgodovino in so poučen primer intenzivno proučevane "vrste", katere taksonomija se je razkrivala sorazmerno s količino vloženega dela. Prvi zapisi segajo v leto 1935, ko je Schellenberg živali opisal kot *N. puteanus* ssp. *krameri* (Schellenberg 1935, 1936). Leta 1954 jih je S. Karaman povzdignil na raven vrste in, na podlagi manjših morfoloških variacij, dodatno opisal še *N. krameri* f. *spinulifemur* in *N. krameri* ssp. *timavi* (Karaman S. 1954). Čez trideset let, leta 1984, je G.S. Karaman pri obeh znotrajvrstnih kategorijah našel avtapomorfne znake in ju povzdignil na vrstno raven (Karaman G.S. 1984). Poleg tega je opazil tudi, da v severni Istri in zaledju tržaškega zaliva populacije *N. krameri* in *N. spinulifemur* sobivajo brez pojava križancev.

V nedavni raziskavi (Fišer in sod. 2006) so med *N. krameri* prepoznali tri geografsko dobro ločene morfotipe, ki jih je mogoče ločiti po vzorcu ščetin na gnatopodih odraslih osebkov. Kljub dobremu ujemanju med morfološkimi in geografskimi podatki so jih, zaradi neznatnih morfoloških razlik, opisali le kot pazinsko, tržaško in čičarijsko morfološko raso in predpostavili, da je vrsta, zaradi slabe sposobnosti razširjanja, v procesu morfološke diferenciacije. Osebki pazinske rase, ki so jih našli v pazinskem flišnem bazenu, imajo dodatne ščetine na karpalnem členu prvega (GI/5) in drugega (GII/5) gnatopoda (Slika 1). Osebki tržaške rase imajo dodatne ščetine le na karpalnem členu prvega gnatopoda (GI/5), našli pa so jih večinoma v tržaškem flišnem bazenu.

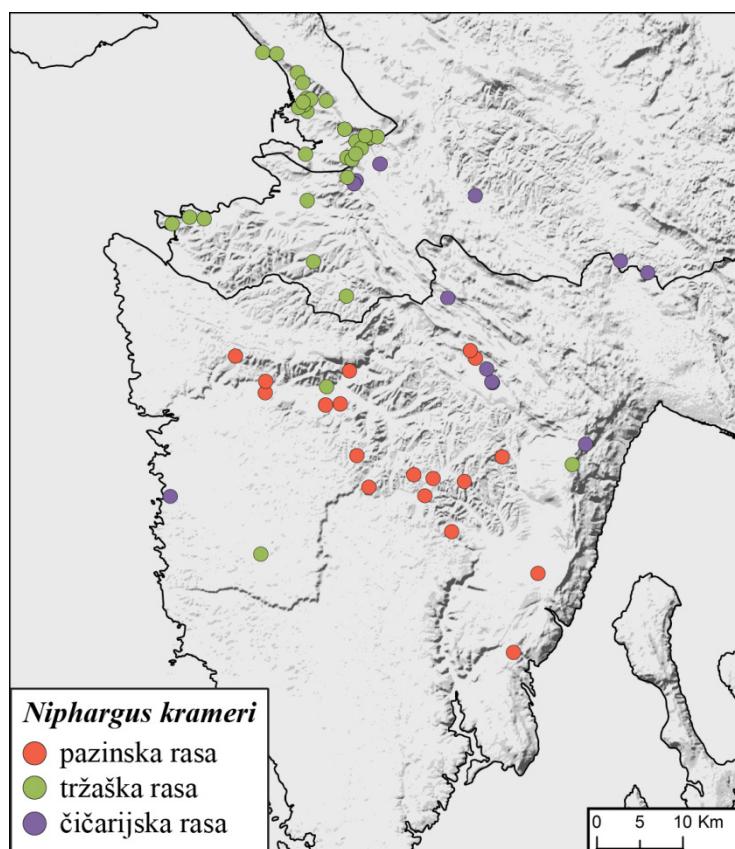
Osebki iz vznožja hribov Čičarije nimajo dodatnih ščetin na gnatopodih in predstavljajo čičarijsko raso. Razširjenost treh ras prikazuje Slika 2.



Slika 1: Vzorec ščetin na karpalnem členu prvega (GI/5) in drugega (GII/5) gnatopoda pri osebku pazinske rase *Niphargus krameri*.

Trije osebki *N. krameri* so bili vključeni v molekulsko raziskavo (Trontelj in sod. 2009), s katero so testirali kriptično diverziteto podzemne vodne makrofavne. Izkazalo se je, da so razlike znotraj *N. krameri* prisotne tudi na molekulski ravni, saj so med njimi prepoznali dva haplotipa.

Na podlagi izsledkov zgoraj predstavljenih raziskav predvidevamo, da je *N. krameri* kompleks dveh ali treh vrst. Namen diplomske naloge je testirati ničelno hipotezo, da je *N. krameri*, po splošnem konceptu vrste, ena vrsta. Želimo pridobiti molekulski podatki in z njimi čim bolj enakomerno pokriti celotno območje razširjenosti *N. krameri*. Filogenetske in filogeografske odnose, ugotovljene na podlagi molekulskih podatkov, želimo primerjati z morfološkimi podatki iz raziskave Fišer in sod. 2006. Nenazadnje želimo rezultate obravnavati v okviru splošnega koncepta vrste (de Queiroz 2005a), predlagati taksonomsko rešitev in orisati vprašanja zanimiva za morebitne nadaljnje raziskave.

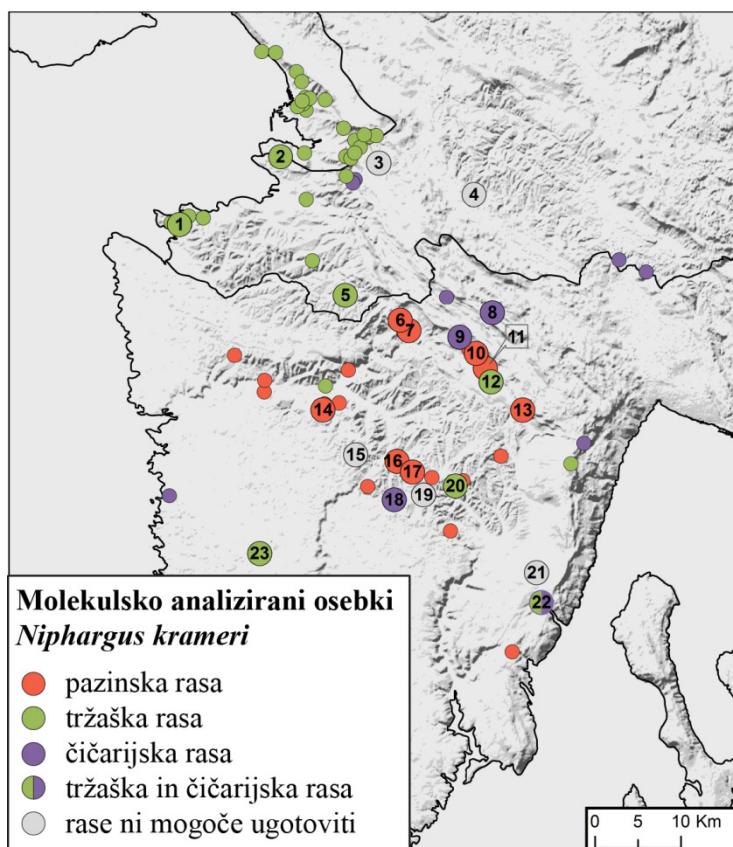


Slika 2: Razširjenost pazinske, tržaške in čičarijske morfološke rase *Niphargus krameri* (prirejeno po Fišer in sod. 2006).

2 MATERIALI IN METODE

2.1 MATERIALI

V analizo smo vključili 42 osebkov *N. krameri* iz 23 lokalitet, pri čemer smo, kjer je bilo mogoče, iz vsake lokalitete analizirali dva osebka. Vzorci so bili nabrani med 10. 3. 2002 in 26. 11. 2010 in so bili do izolacije DNA shranjeni v 96 % etanolu pri - 20 °C. Vsi vzorci in ostanki analiziranih živali so shranjeni v zbirki Katedre za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Kot zunanjike (outgroup) za koreninjenje dreves smo vključili še nukleotidna zaporedja drugih vrst rodu *Niphargus* (Priloga B), od katerih je bila večina analizirana na Katedri za zoologijo, dve nukleotidni zaporedji pa smo vzeli iz spletne baze GenBank. Natančen seznam lokalitet molekulsko analiziranih osebkov *N. krameri* in pripadnost morfološki rasi prikazujeta Priloga A in Slika 3.



Slika 3: Prikaz lokalitet in pripadnosti morfološki rasi molekulsko analiziranih osebkov *Niphargus krameri*. Številke na sliki se ujemajo s številkami in opisi lokalitet v Prilogi A.

2.2 METODE

2.2.1 PREGLED VZORCEV IN MORFOLOGIJE IZBRANIH N. KRAMERI

V Istri poleg *N. krameri* živi tudi morfološko zelo podobna vrsta *N. spinulifemur* Karaman S., zato smo živali iz nabranih vzorcev najprej določili pod stereomikroskopom SZX2-ILLT (Olympus, Japonska). Osebkom *N. krameri*, izbranim za molekulska analizo, smo preverili morfološki znak (vzorec ščetin na GI/5 in GII/5), ki ga navajajo v raziskavi Fišer in sod. 2006 in jih, glede na stanje znaka, razvrstili v pazinsko, tržaško ali čičarijsko morfološko raso.

2.2.2 IZOLACIJA DNA

Po morfološkem pregledu smo izbranim osebkom *N. krameri* z britvico odrezali zadek in pod stereomikroskopom odstranili prebavilo in hitinjačo. Prebavilo pogosto vsebuje simbionte in tkiva zaužitih organizmov, na hitinjačo pa so lahko pritrjeni različni epizoji, ki pri izolaciji lahko kontaminirajo DNA analiziranega osebka. Tako pripravljena tkiva smo prenesli v mikrocentrifugirke in počakali, da je iz tkiva izhlapel ves etanol, ki zavira proteinazo K v procesu izolacije. Genomsko DNA smo izolirali s kompletom "GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit" (Sigma, ZDA) po protokolu "Mammalian Tissue Preparation" navedenem v navodilih proizvajalca. Končne izolate smo shranili v zamrzovalniku pri - 20 °C.

2.2.3 POMNOŽEVANJE DNA V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO (PCR)

V verižni reakciji s polimerazo smo pomnožili 592 baznih parov (bp) dolg odsek mitohondrijskega gena za citokrom oksidazo I (COI), približno 1400 bp dolg odsek jedrnega gena za 28S ribosomske podenoto (28S rRNA) in približno 1800 bp dolg jedrni odsek ribosomske DNA (ITS). S pomnoževanjem DNA v 15 µl reakcijah smo pri vseh treh genih preverili prileganje začetnih oligonukleotidov (primer) na izolirano DNA in optimizirali program PCR. Zadostno količino produktov PCR za določanje nukleotidnih zaporedij smo zagotovili s pomnoževanjem DNA v 45 µl reakcijah. Pri pomnoževanju fragmenta 28S rRNA so pogosto nastali tudi nespecifični produkti PCR, ki smo jih odstranili z izolacijo želenega produkta na agaroznem gelu. Takšne vzorce smo, zaradi izgub pri nadalnjih postopkih, pomnožili v 75 µl reakcijah. Za pomnoževanje DNA smo uporabljali "2720 Thermal Cycler" (Applied Biosystems, ZDA) in "Mastercycler® ep" (Eppendorf, Nemčija).

Sestava 15 µl reakcije:

11,52 µl H₂O

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

1,5 µl 2 mM dNTP (Fermentas, Litva)

0,2 µl [20 µM] začetnega oligonukleotida 1 (primer 1)

0,2 µl [20 µM] začetnega oligonukleotida 2 (primer 2)

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

0,5 µl vzorčne DNA

V 45 µl in 75 µl reakcijah so bili reagenti in razmerja med njimi povsem enaka kot v 15 µl reakcijah.

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

Jerry 5' - CAACATTTATTTGATTTTTGG - 3'

Maggie 5' - GGATAATCAGAATATGGTCGAGG - 3'

Začetna oligonukleotida za odsek gena za 28S rRNA (Fišer in sod., v pripravi):

28S lev3 5' - GCCCTTAAAATGGATGGCGCT - 3'

28S des5 5' - CCGCCGTTACCCGCGCTT - 3'

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

ITS F1 5' - TCCGAACTGGTGCACCTAGA - 3'

ITS R1 5' - TCCAAGCTCCATTGGCTTAT - 3'

Program PCR za pomnoževanje z začetnima oligonukleotidoma Jerry / Maggie

95 °C	4 min
95 °C	1 min
46 °C	1 min
72 °C	1 min 30 s
72 °C	7 min

} 45 x

Program PCR za pomnoževanje z začetnima oligonukleotidoma 28S lev3 / 28S des5

94 °C	7 min
94 °C	45 s
48 °C	30 s
72 °C	1 min
72 °C	7 min

}

40 x

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

94 °C	3 min
94 °C	30 s
53 °C	30 s
72 °C	2 min
72 °C	10 min

}

35 x

Količino in dolžino pomnoženega fragmenta smo po vsakem pomnoževanju preverili s horizontalno elektroforezo v 1 % agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom v 1 x pufru TAE. Dolžino pomnoženega fragmenta smo ocenili s pomočjo standarda "GeneRuler™ 100bp DNA" (Fermentas, Litva).

2.2.4 ČIŠČENJE PRODUKTOV PCR

Pri vzorcih, kjer so pri pomnoževanju nastali le specifični produkti, smo čiščenje produktov PCR opravili s pomočjo membranskega sistema (Millipore, ZDA) po navodilih proizvajalca.

Pri vzorcih, pri katerih so pri pomnoževanju nastali tudi nespecifični produkti, pa je bil protokol naslednji:

- v 75 µl reakciji smo ponovno pomnožili fragment vzorčne DNA,
- celoten produkt PCR smo skupaj z aplikacijskim barvilom (2 µl) nanesli na debelejši 2 % agarozni gel z dodanim etidijevim bromidom,
- elektroforeza je prvih 10 min potekala pri 20 V, nadalje pa pri 55 - 60 V dokler ni aplikacijski pufer pripravljal do sredine gela,
- na transluminatorju smo gel osvetlili z UV svetlobo in s skalpelom označili želeni produkt tako, da smo pod njim naredili zarezo,
- pod želenim produktom smo v gel naredili luknjico, jo očistili ostankov gela in do vrha napolnili z 1 x puferom TAE,

- sledila je elektroforeza pri 200 V (45 s), pri čemer je želeni produkt spralo v pufer v luknjici iz katere smo ju s pipeto prenesli v mikrocentrifugirko,
- luknjico smo ponovno napolnili z 1 x pufrom TAE, zagnali elektroforezo pri 200 V (30 s) in želeni produkt skupaj s pufrom zopet prenesli v mikrocentrifugirko,
- na koncu smo produkt PCR očistili še s kompletom "GeneJETTM PCR Purification Kit" (Fermentas, Litva) po navodilih proizvajalca.

2.2.5 DOLOČANJE IN ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ

Vsem očiščenim produktom PCR so, po Sangerjevi metodi, v podjetju Macrogen (www.macrogen.com, Južna Koreja) določili nukleotidno zaporedje. Pri fragmentih genov za COI in 28S rRNA so uporabili enaka para začetnih oligonukleotidov (Jerry / Maggie in 28S lev3 / 28S des5) kot smo jih pri pomnoževanju teh fragmentov, pri fragmentu ITS pa so poleg začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili pri pomnoževanju (ITS F1 / ITS R1), zaradi dolžine fragmenta, uporabili še štiri dodatne začetne oligonukleotide (ITS SF1, ITS SR1, ITS SF2, ITS SR2) (Flot in sod. 2010).

ITS SF1 5'- CGCTGCCATTCTCACACTTA - 3'

ITS SR1 5'- ACTCTGAGCGGTGGATCACT - 3'

ITS SF2 5'- AAGGCTATACTGGCGATCA - 3'

ITS SR2 5'- TCAGCGGGTAACCTCTCCTA - 3'

S programom ChromasPro 1.5 (Technelysium, Avstralija) smo pregledali kromatograme zaporedij in popravili nekatere napake. Zaporedja smo poravnali s programom Muscle 3.8.31 (Egdar 2004). V programu BioEdit 7.0.5.3 (Hall 1999) smo, kjer je bilo mogoče, odstranili začetne oligonukleotide oziroma odstranili začetne in končne dele zaporedij z šumom, kjer začetnih oligonukleotidov nismo našli. Zaporedja COI smo s programom DAMBE 5.2.5 (Xia & Xie 2001) po kodu za nevretenčarsko mitohondrijsko DNA prevedli v aminokislinsko zaporedje in preverili morebitno prisotnost stop kodonov. Pri zaporedjih 28S rRNA in ITS to ni bilo potrebno, ker ne kodirajo proteinov.

2.2.6 FILOGENETSKE ANALIZE

Filogenetske analize smo izvedli ločeno na poravnanih zaporedjih odsekov genov za COI, 28S rRNA ter ITS in na združenih zaporedjih odsekov genov za COI in 28S rRNA. Zaporedja smo združili tako, da smo zaporedjem gena za 28S rRNA pripeli zaporedja gena za COI. Te štiri nize podatkov smo uporabili za ugotavljanje filogenetskih odnosov po metodi največjega verjetja (maximum likelihood) in z Bayesovim pristopom (Bayes inference). Med potekom raziskave smo si pomagali s preliminarnimi filogenetskimi drevesi narejenimi po metodi povezovanja sosedov (neighbour joining) s programom MEGA 5.01 (Kumar in sod. 2011).

Za koreninjenje dreves smo pri različnih nizih podatkov kot zunanjike (outgroup) uporabili različne nabore drugih vrst rodu *Niphargus*. Izbera vrst je slonela na prisotnosti ustreznih nukleotidnih zaporedij v bazi Katedre za zoologijo in spletne baze GenBank. Seznam vrst in dostopnost nukleotidnih zaporedij sta prikazana v Prilogi B.

S programom jModelTest 0.1.1 (Posada 2008) smo za vsak niz podatkov po kriteriju AIC (Akaike information criterion) ocenili najustreznejši substitucijski model. Ker so bili vsi predlagani modeli le različice z minimalnimi odstopanjmi od modela GTR + Γ + I, smo pri vseh nadalnjih analizah uporabili kar slednjega.

Z metodo največjega verjetja iščemo tisto topologijo drevesa, pri kateri je verjetnost, da bomo po določenem substitucijskem modelu dobili dano poravnavo zaporedij, največja. Drevo največjega verjetja smo iskali z dodatkom PHYML 2.0.6 (Guindon & Gascuel 2003) programa Geneious 5.3.4 (Biomatters). Razmerje tranzicij in transverzij smo prepisali iz izračunov programa jModelTest. Delež nevariabilnih mest zaporedja in parameter α porazdelitve γ smo pustili oceniti dodatku PHYML, število diskretnih kategorij porazdelitve γ pa smo nastavili na 6. Statistično podporo kladov smo ocenili z neparametričnim testom samovzorčenja (nonparametric bootstrap test) s 1000 ponovitvami.

S programom MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) smo iskali Bayesovo drevo filogenetskih odnosov. Pri vseh nizih podatkov smo uporabili 6 diskretnih kategorij porazdelitve γ . Pri zaporedjih gena za COI smo vsa tri kodonska mesta obravnavali ločeno tako, da je program za vsako ocenil stopnjo substitucije in α parameter, neodvisno od

drugih dveh. Takšen pristop lahko natančneje prikaže filogenetske odnose, saj vemo, da mesta v kodonu različno hitro evoluirajo. Na enak način smo obravnavali obe samostojni enoti pri združenih COI in 28S rRNA zaporedjih. Dva neodvisna MCMCMC ("Metropolis Coupouled Monte Carlo Markov Chain") algoritma, vsak z eno hladno in tremi vročimi verigami, sta vzorčila pokrajino vseh možnih dreves, pri čemer se je na 100 generacij shranilo stanje hladne verige. Pri zaporedjih COI, 28S rRNA in združenih zaporedjih COI in 28S rRNA je bilo za konvergenco dovolj 2×10^6 generacij, pri zaporedjih ITS pa je že 10^6 generacij več kot zadostovalo. V vseh primerih smo zavrgli prvo četrtino povzročenih dreves in iz ostalih sestavili 50 % večinsko drevo soglasja (50 % majority rule consensus tree), ki v primeru ITS temelji na 15000 drevesih, v ostalih primerih pa na 30000 drevesih. Statistično podporo kladov nam prikazujejo posteriorne verjetnosti. S programom FigTree 1.3.1 (Rambaut 2006) smo drevesa soglasja uredili tako, da so bolj pregledna.

Patristična genetska razdalja med dvema taksonoma na filogenetskem drevesu je enaka vsoti dolžin vej med njima in predstavlja mero genetske razlike med njima. S programom Patristic 1.0 (Fourmanet & Gibbs 2006) smo iz drevesa največjega verjetja za gen COI izračunali patristične razdalje med analiziranimi osebki *N. krameri*. Povprečne patristične razdalje med in znotraj kladov smo izračunali v Excelu.

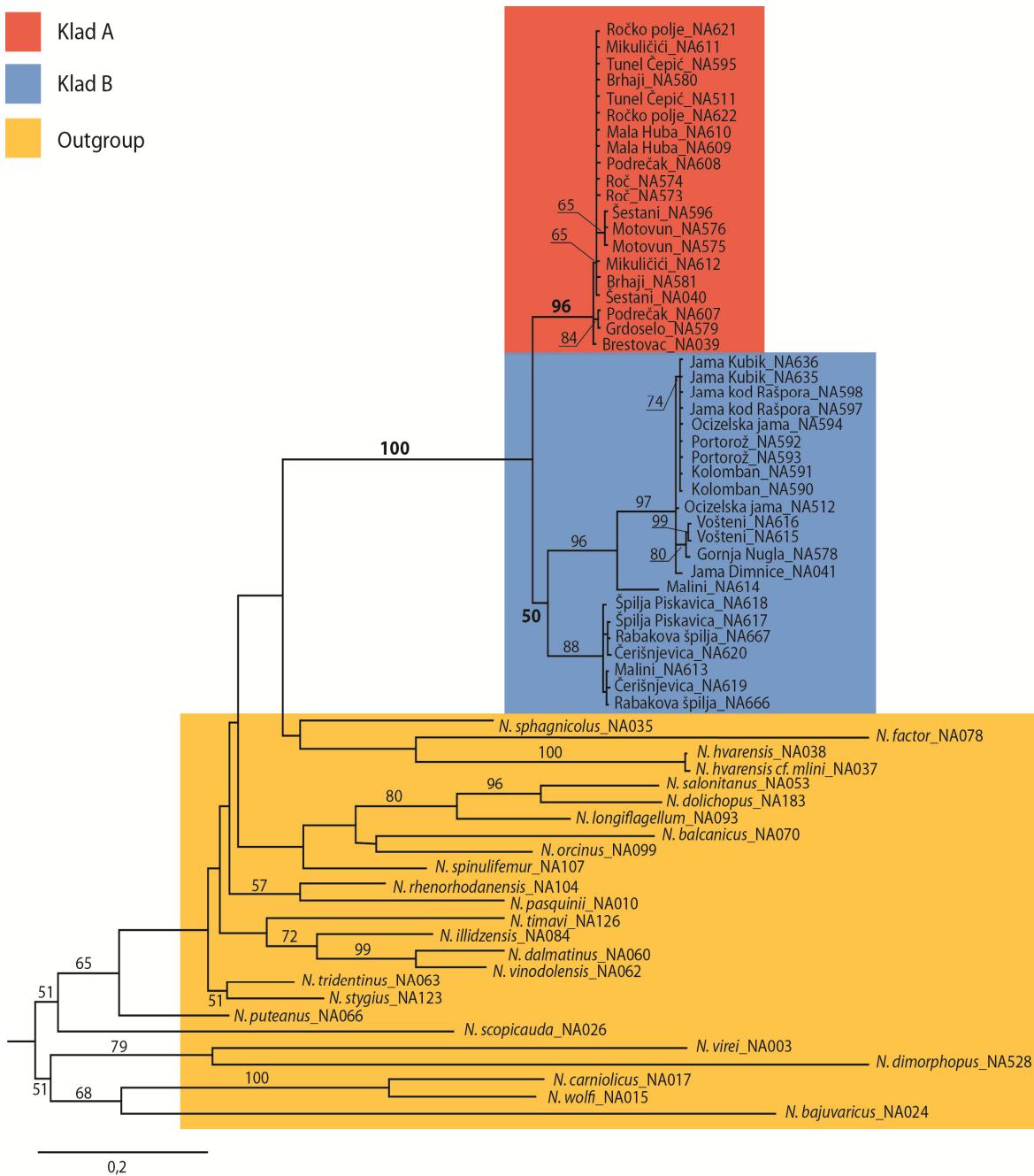
3 REZULTATI

3.1 FILOGENETSKA DREVESA

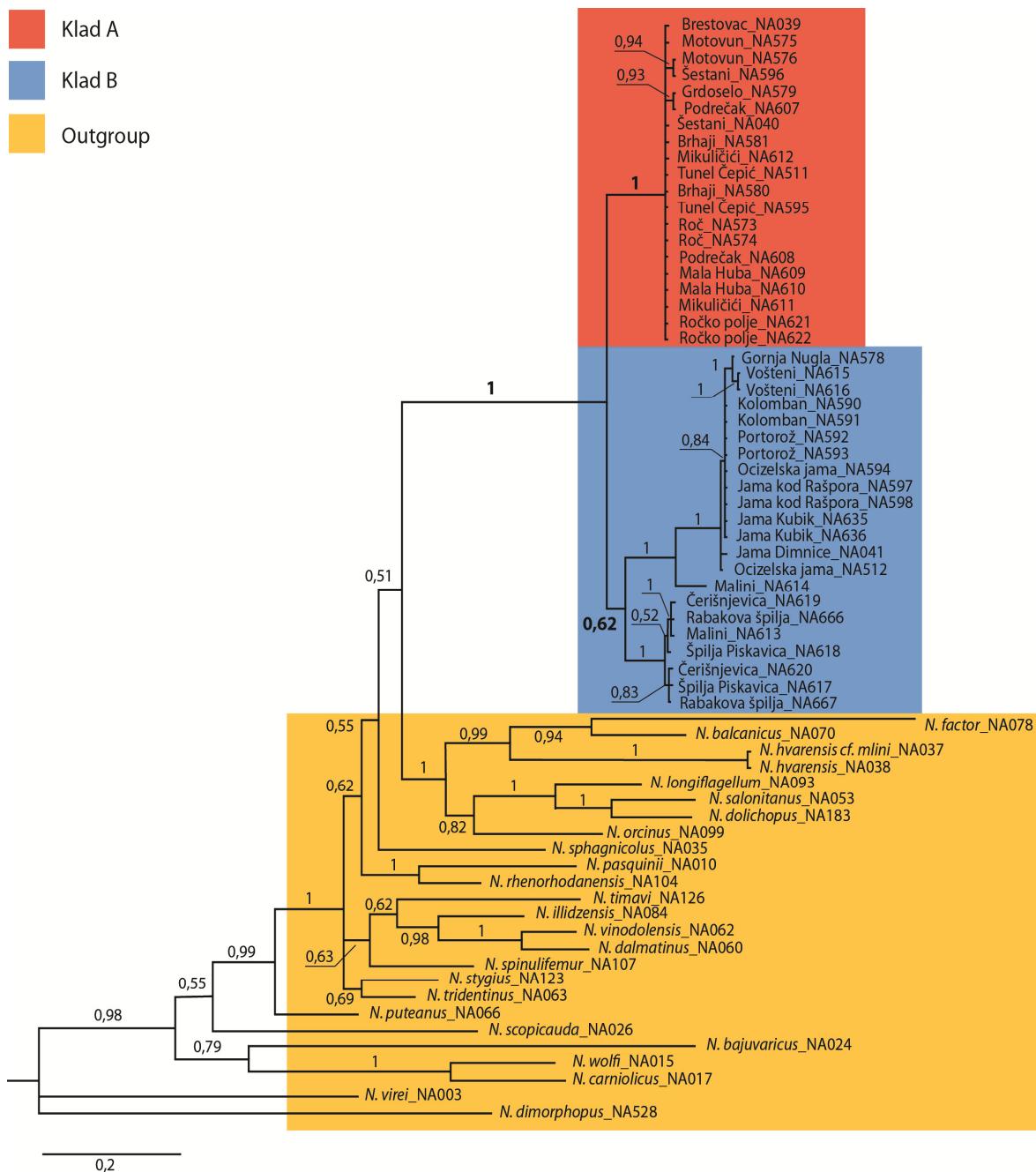
Vsa spodaj prikazana filogenetska drevesa imajo enako topologijo bazalnih cepitev znotraj kompleksa *N. krameri* in so visoko podprta. Gen za 28S rRNA je sorazmerno konzervativen in se pogosto uporablja v filogenetskih analizah, ki vključujejo manj sorodne organizme. Zasičenje filogenetskega signala, ki lahko vodi v napačne rezultate, je v takšnih primerih manj verjetno. Zato smo ta zaporedja analizirali skupaj z množico drugih vrst rodu *Niphargus*, ki smo jih izbrali tako, da smo zaobjeli večino znotraj rodovne genetske pestrosti predvidene v Fišer in sod. 2008. Filogenetski analizi teh zaporedij (Slika 4, Slika 5) sta nam služili kot test monofilije skupine *N. krameri*, ki se je izkazala za monofiletsko. Monofilijo skupine potrjujejo tudi vsa ostala drevesa, pri čemer na prvi pogled zmotita nizki podpori pri zaporedjih gena za COI (Slika 6, Slika 7). Vendar je to razumljiva posledica dejstva, da je gen za COI razmeroma nekonzervativen in je zaradi zasičenja filogenetskega signala prišlo do homoplazij med *N. krameri* in ostalimi vrstami.

Vsa drevesa prikazujejo delitev *N. krameri* na dva samostojna klada z visoko podporo. Klad A združuje osebke, ki morfološko ustrezano pazinski rasi, klad B pa osebke, ki ustrezano tržaški in čičarijski rasi. Pregleden seznam pripadnosti analiziranih osebkov morfološki rasi in molekulskemu kladu prikazuje Priloga C. Opazna je tudi razlika v variabilnosti znotraj obeh kladov. Struktura klada A je homogena, kar je še posebej razvidno iz obeh dreves, ki temeljita na zaporedjih 28S. Klad B pa je heterogen tako molekulsko kot morfološko, vendar se podatkovni nizi med seboj ne ujemajo. Nazoren primer sta osebka iz izvira Malini (N0613, N0614), ki pripadata različnima morfološkima rasama, imata precej različno nukleotidno zaporedje 28S in zelo podobno nukleotidno zaporedje COI. Ta izvir je do sedaj tudi edina lokacija, kjer smo ugotovili sintopno pojavljanje dveh morfoloških ras.

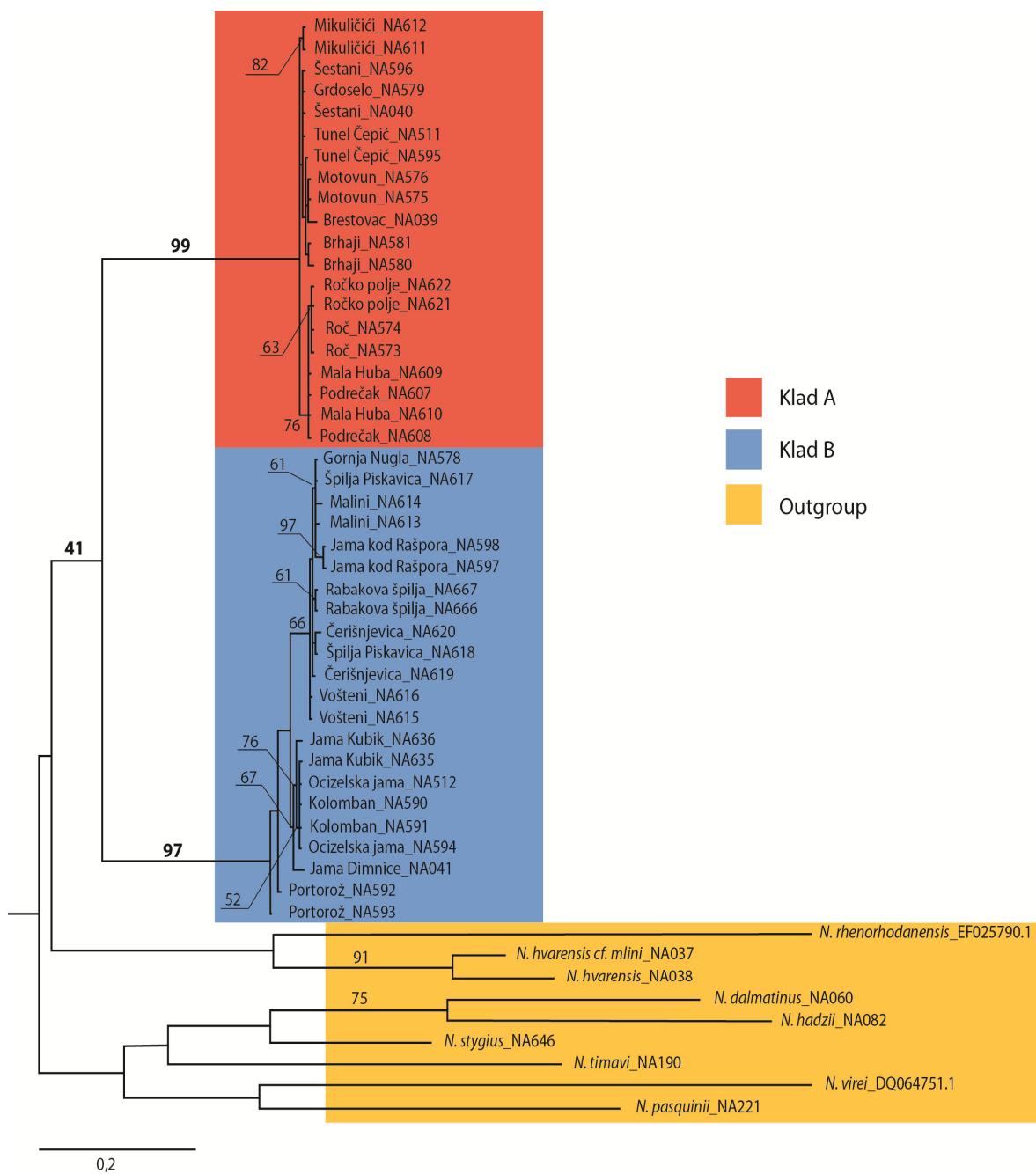
Analiza zaporedij ITS nam je služila le kot dodatno preverjanje delitve *N. krameri* na dva klada, zato smo uporabili le pet osebkov. Ker tudi ta zaporedja, ki so neodvisna od 28S in COI, podpirajo delitev, smo lahko prepričani, da med obema kladoma ni genskega pretoka.



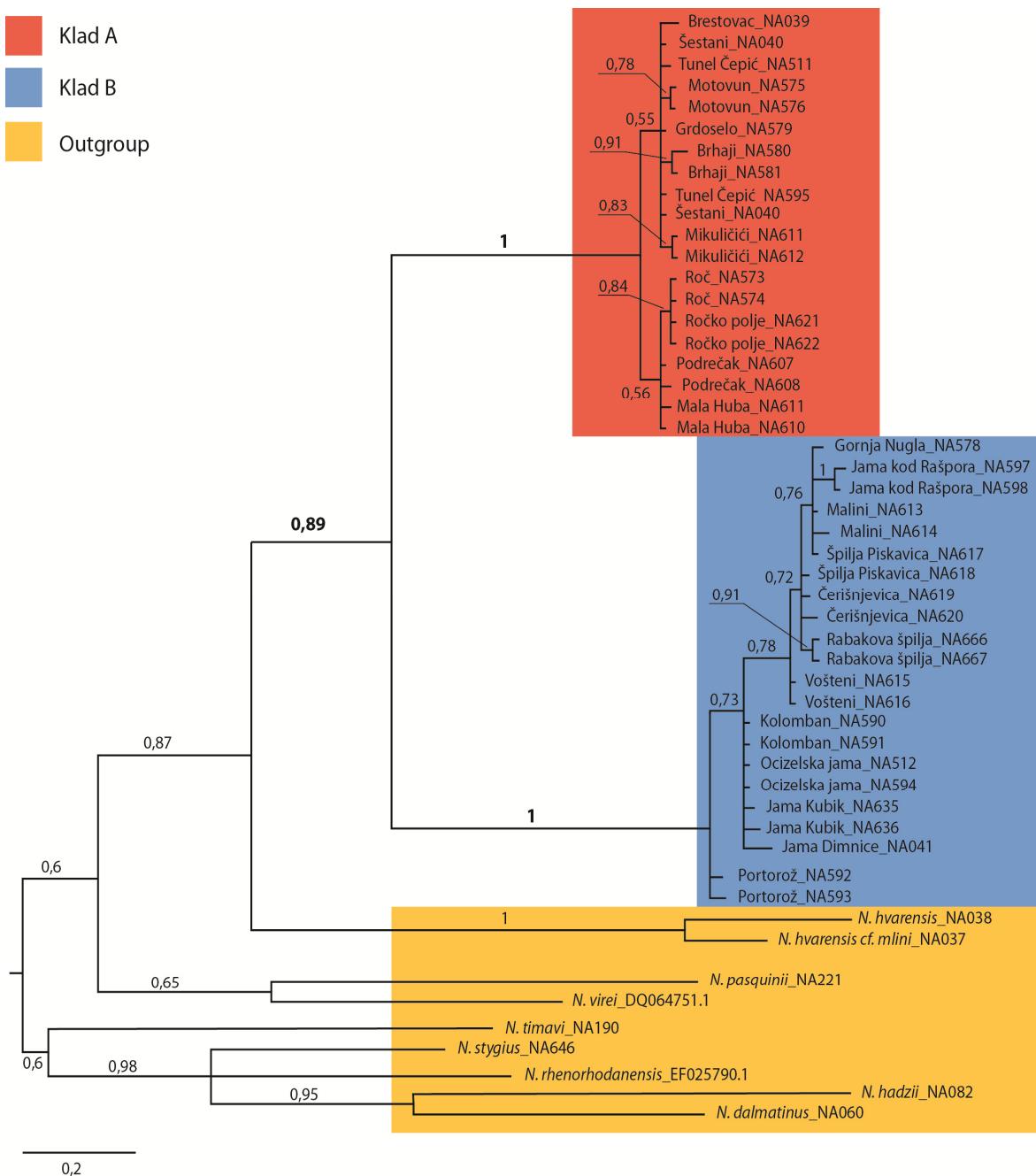
Slika 4: Drevo filogenetskih odnosov med osebki različnih populacij *Niphargus krameri* na podlagi gena za 28S rRNA po metodi največjega verjetja. Številke prikazujejo vrednosti neparametričnega testa samovzorčenja oziroma statistično podporo posameznih kladov izraženo v odstotkih. Prikazane so le podpore višje od 50 odstotkov. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami ocenjenimi z GTR + Γ + I. Merilo prikazuje dolžino podpisane genetske razdalje (število sprememb na nukleotidno mesto).



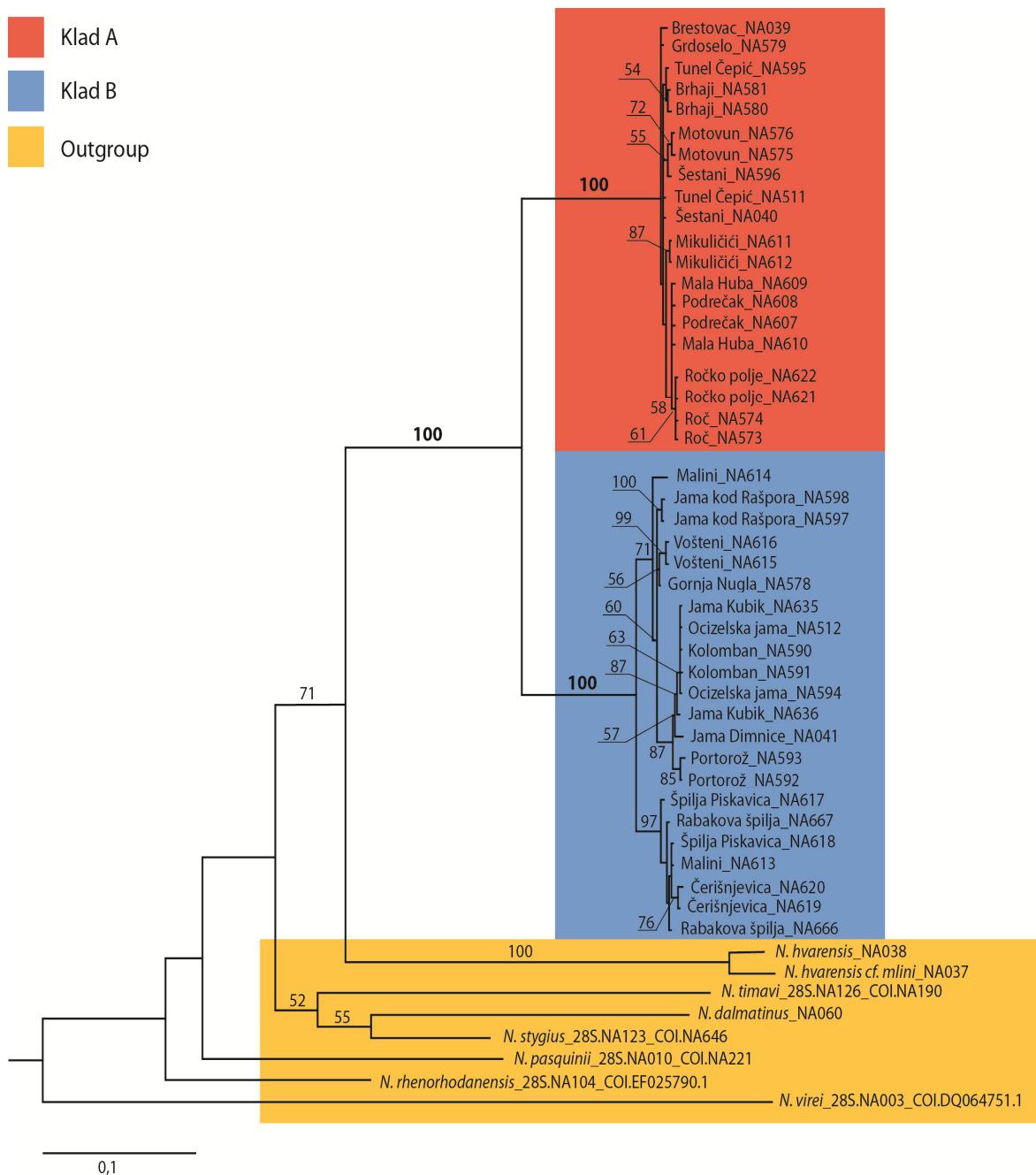
Slika 5: Drevo filogenetskih odnosov med osebki različnih populacij *Niphargus krameri* na podlagi gena za 28S rRNA po Bayesovi metodi. Številke prikazujejo posteriorne verjetnosti oziroma statistično podporo posameznih kladov izraženo v deležih. Prikazane so le podpore višje od 0,5. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami ocenjenimi z GTR + Γ + I. Merilo prikazuje dolžino podpisane genetske razdalje (število sprememb na nukleotidno mesto).



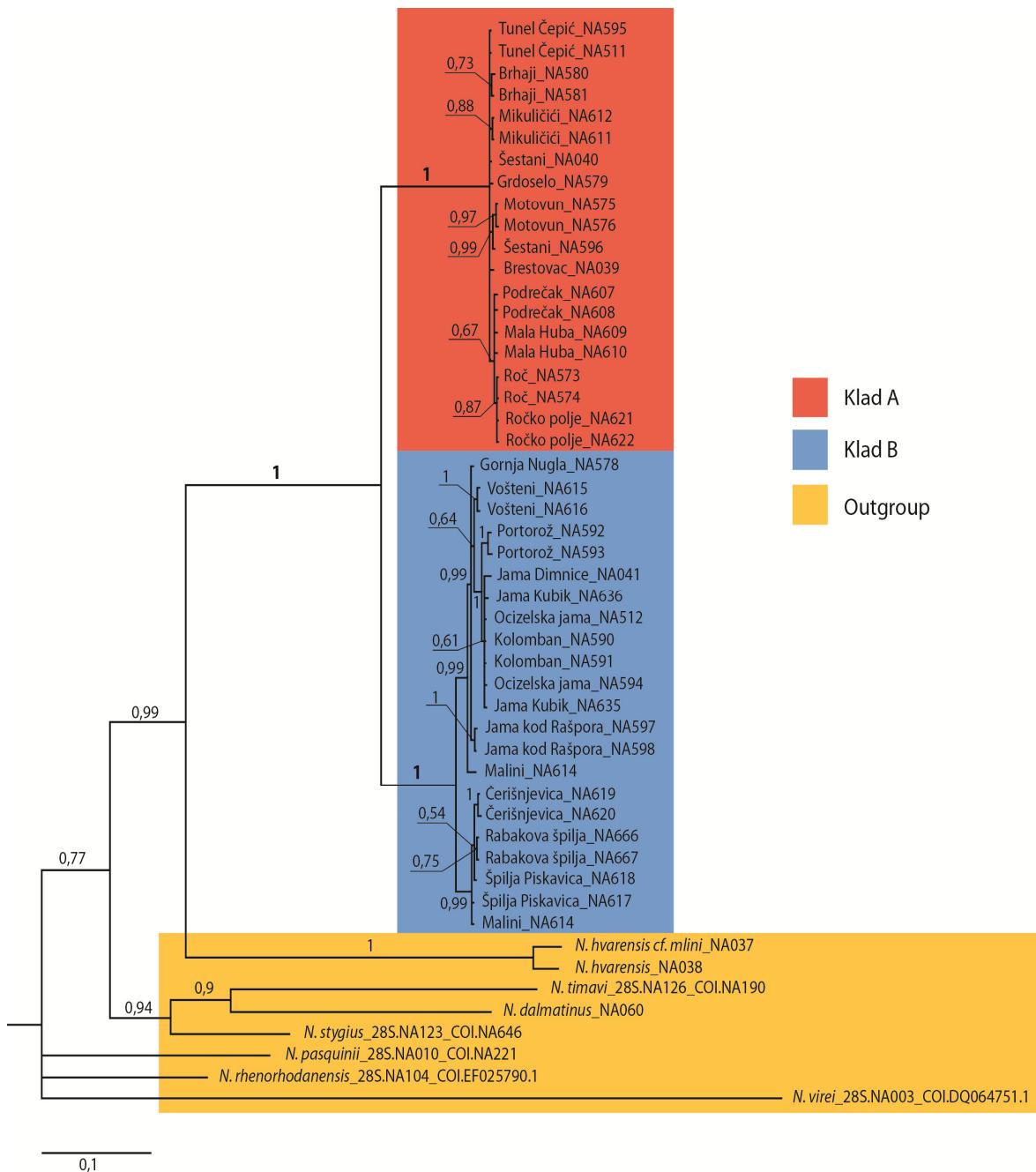
Slika 6: Drevo filogenetskih odnosov med osebki različnih populacij *Niphargus krameri* na podlagi gena za COI po metodi največjega verjetja. Številke prikazujejo vrednosti neparametričnega testa samovzorčenja oziroma statistično podporo posameznih kladov izraženo v odstotkih. Prikazane so le podpore višje od 50 odstotkov. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami ocenjenimi z GTR + Γ + I. Merilo prikazuje dolžino podpisane genetske razdalje (število sprememb na nukleotidno mesto).



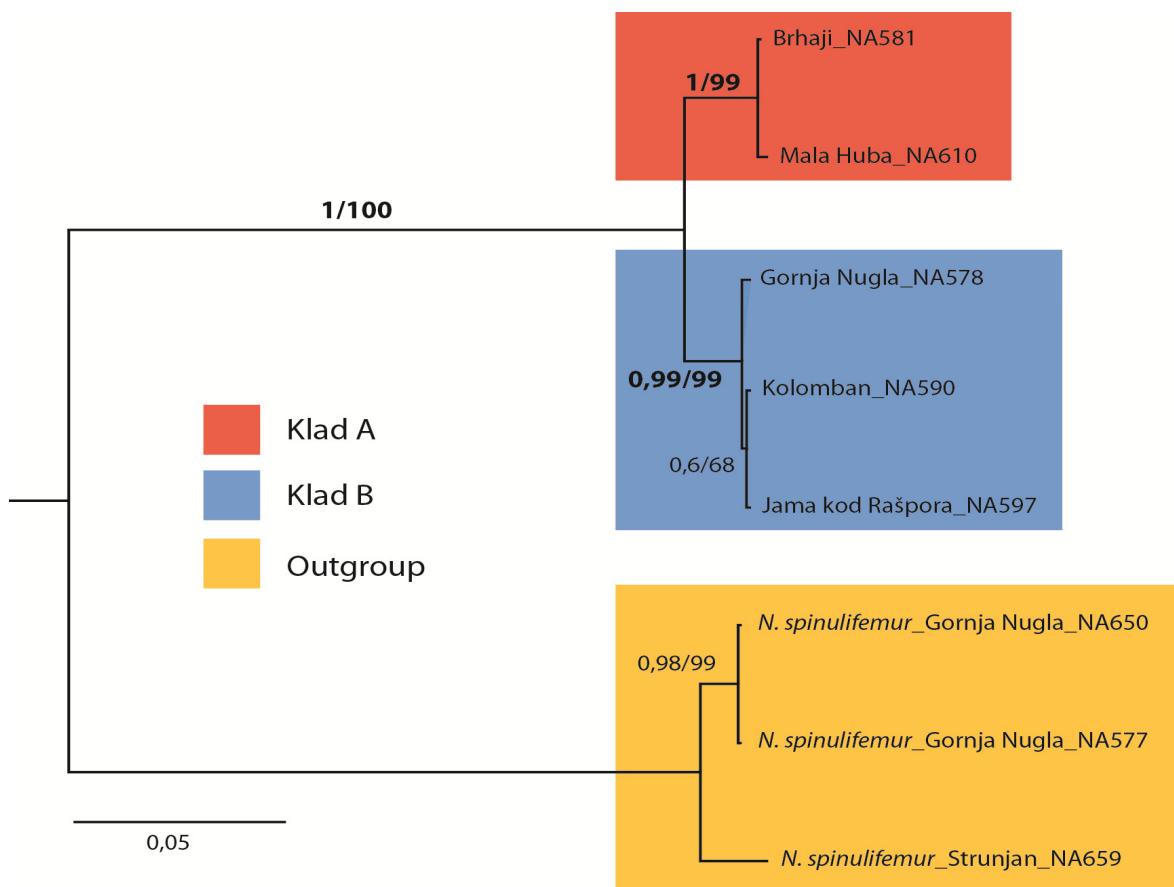
Slika 7: Drevo filogenetskih odnosov med osebki različnih populacij *Niphargus krameri* na podlagi gena za COI po Bayesovi metodi. Številke prikazujejo posteriorne verjetnosti ozziroma statistično podporo posameznih kladov izraženo v deležih. Prikazane so le podpore višje od 0,5. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami ocenjenimi z GTR + Γ + I. Merilo prikazuje dolžino podpisane genetske razdalje (število sprememb na nukleotidno mesto).



Slika 8: Drevo filogenetskih odnosov med osebki različnih populacij *Niphargus krameri* na podlagi združenih genov za 28S rRNA in COI po metodi največjega verjetja. Številke prikazujejo vrednosti neparametričnega testa samovzorčenja ozziroma statistično podporo posameznih kladov izraženo v odstotkih. Prikazane so le podpore višje od 50 odstotkov. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami ocenjenimi z GTR + Γ + I. Merilo prikazuje dolžino podpisane genetske razdalje (število sprememb na nukleotidno mesto).



Slika 9: Drevo filogenetskih odnosov med osebki različnih populacij *Niphargus krameri* na podlagi združenih genov za 28S rRNA in COI po Bayesovi metodi. Številke prikazujejo posteriorne verjetnosti oziroma statistično podporo posameznih kladov izraženo v deležih. Prikazane so le podpore višje od 0,5. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami ocenjenimi z GTR + Γ + I. Merilo prikazuje dolžino podpisane genetske razdalje (število sprememb na nukleotidno mesto).



Slika 10: Drevo filogenetskih odnosov med osebki različnih populacij *Niphargus krameri* na podlagi gena ITS po metodi največjega verjetja in po Bayesovi metodi. Prva številka prikazuje posteriorne verjetnosti v deležih, druga številka prikazuje vrednosti neparametričnega testa samovzorčenja izražene v odstotkih. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami ocenjenimi z GTR + Γ + I. Merilo prikazuje dolžino podpisane genetske razdalje (število sprememb na nukleotidno mesto).

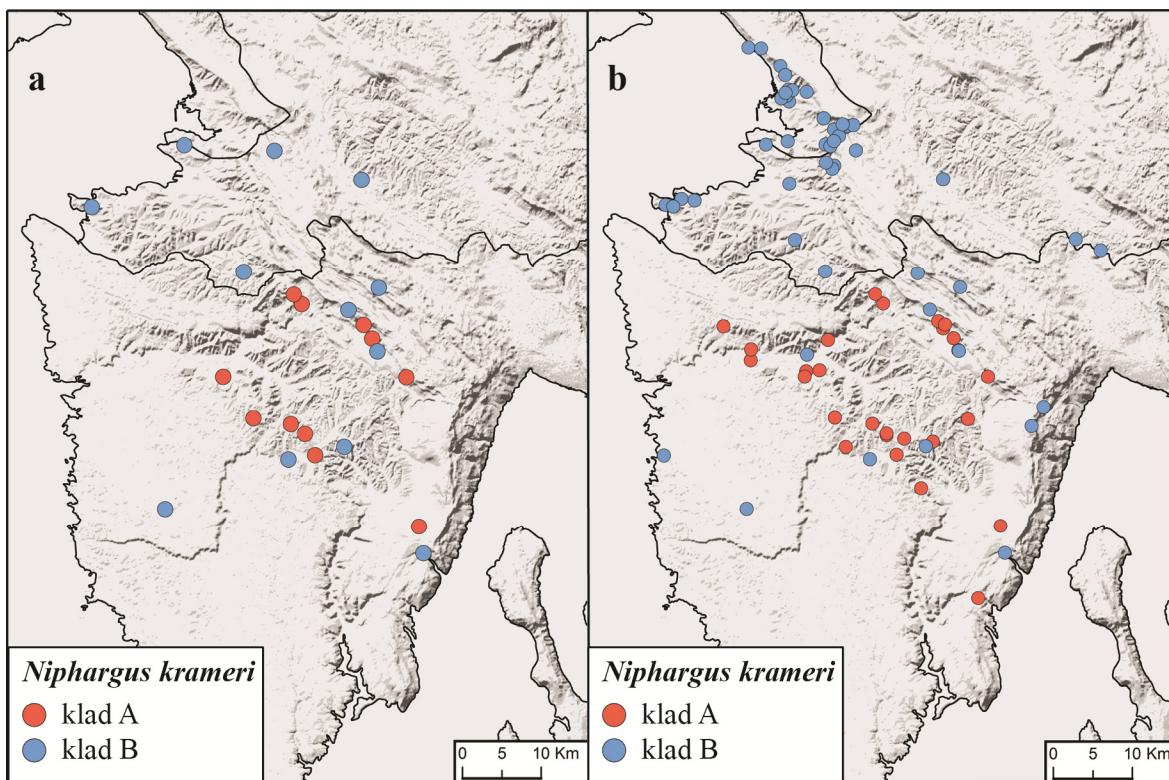
3.2 PATRISTIČNE GENETSKE RAZDALJE

	Klad A	Klad B
Klad A	0,0075	
Klad B	0,2680	0,0163

Tabela 1: Povprečne patristične razdalje znotraj in med kladoma A in B vrste *Niphargus krameri*, izračunane iz drevesa največjega verjetja za gen COI.

V raziskavi Lefébure in sod. 2006b, kot povprečno patristično razdaljo pri genu COI, ki optimalno ločuje znotraj in medvrstno divergenco pri rakih, navajajo vrednost 0,16 sprememb na nukleotidno mesto. Povprečna patristična razdalja med kladoma A in B vrste *N. krameri* je znatno večja od te vrednosti (Tabela 1). Znotraj klada A je povprečna patristična razdalja zelo majhna, znotraj klada B pa približno dvakrat večja, kar se ujema z ugotovljeno razliko v molekulski in morfološki variabilnosti obeh kladov.

3.3 FILOGEOGRAFSKA OBRAVNAVA



Slika 11: Lokalitete molekulsko analiziranih osebkov klada A in klada B *Niphargus krameri* (a) in z ekstrapolacijo molekulsko analize na morfološke podatke predvidena razširjenost klada A in klada B *Niphargus krameri* (b).

Na zemljevidu Istre smo s programom ArcGIS (ESRI, ZDA) prikazali lokalitete molekulsko analiziranih osebkov obeh kladov, ki sta očitno razširjena simpatrično (Slika 11a). Klad A je razširjen v pazinskem flišnem bazenu, klad B pa poseljuje zaledje Tržaškega zaliva, Slovensko Primorje, Čičarijo in južne predele pazinskega flišnega bazena. Manjši in enotnejši areal klada A se zdi ugnezden v večji in bolj razčlenjen areal klada B. Za boljšo predstavo o geografski razširjenosti obeh kladov smo lokalitete iz raziskave Fišer in sod. 2006 glede na podatke o pripadnosti morfološki rasi razdelili v oba klada in jih dodali k našim lokalitetam z molekulskimi in morfološkimi podatki. To smo storili na podlagi ugotovitve, da klad A vsebuje osebke pazinske rase, klad B pa osebke tržaške in čičarijske rase. Opisano ekstrapolacijo molekulsko analize prikazuje Slika 11b, ki služi kot napoved arealov obeh kladov in iz katere je simpatrija še očitnejša.

4 RAZPRAVA

4.1 TAKSONOMSKA OBRAVNAVA

Ne glede na izbrani gen (28S, COI, ITS) in uporabljeno metodo filogenetske analize (metoda največjega verjetja, Bayesov pristop) vsa filogenetska drevesa prikazujejo *N. krameri* kot monofiletsko skupino z dvema kladoma, ki vedno vsebuje iste osebke. Podpore bazalnim cepltvam so visoke, morebitna odstopanja pa pojasnjujemo z različno variabilnostjo genskih markerjev. Gena za 28S rRNA in COI pripadata različnima genomoma, ki se dedujeta neodvisno eden od drugega, zato lahko trdimo, da med omenjenima kladoma ni genskega pretoka. Trditev dodatno potrjuje analiza zaporedij ITS petih osebkov. Iz filogenetskih dreves je razvidna tudi genetska homogenost klada A in heterogenost klada B.

Morfološke razlike nam ponujajo še en neodvisen nabor podatkov, ki se ujema z molekulskimi rezultati. Klad A, ki ga tvori le pazinska rasa, je tudi morfološko homogen, klad B pa je, podobno kot molekulsko, tudi morfološko heterogen in ga sestavljata tržaška in čičarijska rasa. Vzorec ščetin na karpalnem členu prvega gnatopoda (GI/5) je znotraj klada B variabilen znak, medtem ko je prisotnost ali odsotnost dodatnih ščetin na karpalnem členu drugega gnatopoda (GII/5) ustaljen znak, ki ločuje oba klada in omogoča zanesljivo razvrstitev osebkov v enega ali drugega. Ta neznatna in zlahka spregledana razlika nam dovoljuje, da ne govorimo o kriptičnosti, kar je danes zelo pogost in moden zaključek molekulskih taksonomskih raziskav, in nas obenem opozarja na slabo morfološko proučenost vsaj nekaterih "kriptičnih vrst" (Fišer & Zagmajster 2009, Jugovic in sod. 2011).

Razlike v molekulski in morfološki variabilnosti se ujemajo tudi z razliko v velikosti in razčlenjenosti arealov obeh kladov.

Simpatrična areala in skladnost raznovrstnih molekulskih in morfoloških podatkov, ki ločujejo *N. krameri* v dva klada, kaže na izoliranost genskih skladov obeh skupin populacij. Klada potemtakem predstavljata ločeno evoluirajoči pokolenji metapopulacij, kar je po splošnem konceptu vrste (de Queiroz 2005a) dovolj, da ju obravnavamo kot samostojni vrsti. Velikost povprečne patristične razdalje med kladoma prav tako govori o razlikah, ki so značilne za medvrstno raven. Na podlagi teh dejstev zavračamo našo

ničelno hipotezo in predlagamo, da se *N. krameri* obravnava kot kompleks dveh vrst. Po ICZN (International Code of Zoological Nomenclature) klad A ostane *N. krameri*, ker vsebuje živali iz tipske lokalitete (izvir v bližini Pazina), klad B pa je treba opisati kot novo vrsto.

Odkar se metapopulaciji razvijata kot dve pokolenji brez vmesnega genskega pretoka, oziroma od speciacije (*sensu de Queiroz*) dalje, sta vrsti neodvisno spremenjali svoje lastnosti. Vrsti sta fenotipsko prepoznavni, monofiletski in, glede na simpatrična areala, verjetno celo reproduktivno nekompatibilni. Pričakovati smemo, da zasedata unikatni ekološki niši. Te lastnosti bi zadostile tudi pogoju, ki jih zahtevajo nekateri drugi koncepti vrste (npr. morfološki, filogenetski, ekološki, biološki), da dve ločeni pokolenji metapopulacij obravnavamo kot samostojni vrsti.

4.2 SCENARIJI SPECIACIJE ZNOTRAJ KOMPLEKSA *N. KRAMERI*

Da bi prepoznali prožilce in potek speciacije obeh vrst bi morali vedeti, kaj ju loči in jima preprečuje navzkrižno razmnoževanje. Simpatričnost njune razširjenosti ne ponuja enostavnega odgovora, ki je pri roki v primeru geografsko ločenih populacij (Holsinger 2000). Današnji vzorec lahko razložimo s tremi scenariji: (1) ekološko speciacijo (simpatrično speciacijo, adaptivnim premikom), (2) alopatrično speciacijo (vikariantno speciacijo) s kasnejšimi migracijami ter posledično simpatrijo in (3) alopatrično speciacijo v še danes ločenih prostorih. V nadaljevanju razprave želimo podrobneje predstaviti te scenarije in nekaj načinov za njihovo preverjanje.

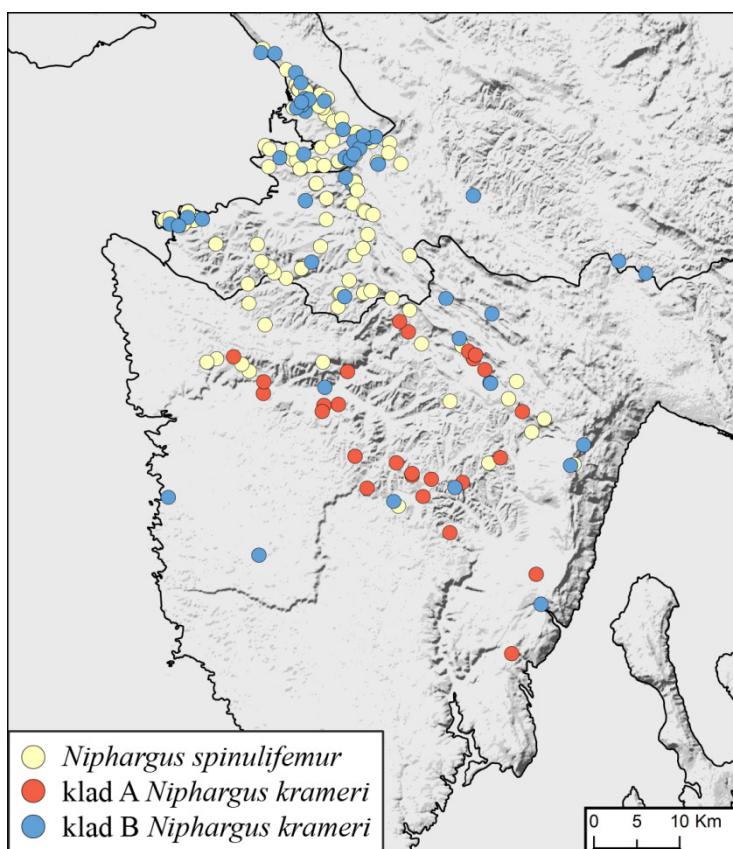
Ad 1) Ekološka speciacija je proces pri katerem se, zaradi prilagajanja na različne ekološke dejavnike, med populacijami zmanjša ali prekine genski pretok (Schluter 2009). Glede na to, da večina vrst rodu *Niphargus* živi v podzemeljskih vodah (Sket 1999a, Fišer in sod. 2009), *N. krameri* pa poseljuje tako podzemne kot površinske vode, bi bila delitev slednjega na podzemno in površinsko vrsto elegantna rešitev. Vendar temu ni tako, saj obe vrsti najdemo v obeh tipih voda. Dejstvo, da do sedaj še nismo našli obeh vrst na isti lokaliteti, pa namiguje na to, da se morda vode, ki jih naseljujeta, razlikujejo v nekaterih ekoloških dejavnikih in imata vrsti različne okoljske zahteve (Fišer in sod. 2010). Morda vrsti zaradi različnega fiziološkega ustroja naseljujeta vode z različnimi fizikalnimi ali kemijskimi lastnostmi. Slednje je mogoče preveriti z meritvami abiotskih dejavnikov kot

so temperatura, nasičenost s kisikom, pH in prevodnost voda, v katerih vrsti živita. V tem primeru bi bila vsaka vrsta v svojem okolju kompeticijsko močnejša, kar bi preprečevalo razširjanje druge vrste v to okolje.

Morda pa so bili za morebitno ekološko speciacijo biotski dejavniki pomembnejši kot abiotski. *N. krameri* pogosto najdemo skupaj z morfološko zelo podobno vrsto *N. spinulifemur*, ki je po vzorcu ščetin na gnatopodih bolj podobna osebkom klada A kot osebkom klada B kompleksa *N. krameri*. Razlike bi lahko nastale med tistimi *N. krameri*, ki sobivajo z *N. spinulifemur* in tistimi, ki ne. Kompeticija z zelo podobno vrsto bi namreč *N. krameri* silila v izrabo nove ekološke niše in morebitno premestitev znaka (character displacement) (Schluter 2000). Ob sobivanju z *N. spinulifemur*, ki ima na gnatopodih veliko dodatnih ščetin, bi se ščetine na gnatopodih *N. krameri* predvidoma izgubile, ker bi ta ob kompeticijsko močnejšem *N. spinulifemur* le v manjši meri izrabljala njihovo funkcijo (npr. ob prehodu na drugačen način prehranjevanja). Ostale populacije *N. krameri*, ki ne živijo v kompeticiji z *N. spinulifemur*, bi dodatne ščetine na gnatopodih obdržale, saj bi jih osebki še naprej s pridom uporabljali. Osnova za tako razlago je bil članek Fišer in sod. 2006, v katerem podatki o razširjenosti *N. spinulifemur* sovpadajo z večino najdenih *N. krameri* brez dodatnih ščetin (tržaško in čičarijsko raso). Vendar po molekulske analizi in podrobnejšem pregledu vseh znanih geografskih podatkov lahko trdimo, da je takšen scenarij malo verjeten, saj se *N. spinulifemur* pojavlja z obema novima vrstama (Slika 12). Kljub temu, poleg kompeticije z *N. spinulifemur*, obstaja še veliko drugih težko zaznavnih in preverljivih biotskih dejavnikov, ki bi lahko vplivali na ekološko speciacijo znotraj *N. krameri*.

Ad 2) Alopatrična speciacija je proces pri katerem se zaradi prostorskih preprek zmanjša ali prekine genski pretok med populacijami, ki se potem ločeno razvijajo (Futuyma 2009). Zanimiva se zdi možnost, da je šlo pri novih vrstah za alopatrično speciacijo s poznejšimi migracijami, ki so ustvarile današnja simpatrična areala. Hrbet južno od Dragonje, ki je nastal ob rotaciji padskega segmenta Jadranske mikroplošče s podrivanjem Istre proti severovzhodu (Placer in sod. 2010), bi predstavljal pomembno razmejitve in izolacijsko bariero med območji Rižane ter Dragonje na severni in Mirne na južni strani. Tako bi lahko nastali severna (B) in južna (A) vrsta. Ob spremembi povodij in vzpostavitvi bodisi površinskih bodisi podzemeljskih povezav bi bila osebkom severne vrste omogočena

migracija na južni rob pazinskega flišnega bazena. Ni nujno, da te povezave še vedno obstajajo, saj bi za naselitev živali zadostovalo že razmeroma kratko obdobje povezanosti.



Slika 12: Razširjenost vrste *Niphargus spinulifemur* se prekriva s kladom A in kladom B *Niphargus krameri*.

Ad 3) Teoretično obstaja tudi možnost, da vrsti še vedno naseljujeta ločeni povodji. Čeprav na dvodimenzionalnem zemljevidu razširjenosti, prostor, kjer obe vrsti bivata, izgleda enoten in povezan, moramo upoštevati, da je hidrogeološka situacija v Istri zelo zapletena. Izmenjavanje flišne in apnenčaste podlage določa izmenjavo in preplet površinskih in podzemnih hidroloških omrežij. Četudi bi Dragonjski hrbet ločeval površinske vode Slovenskega Primorja in pazinskega flišnega bazena, bi lahko podzemne povezave združevale osebke klada B na južnem obrobju pazinskega flišnega bazena z osebki istega klada v Slovenskem Primorju. Vode, ki bi na apnencu poniknile dovolj globoko, bi se lahko v celoti izognile flišni prepreki ali pa prišle na površje šele ob stiku z globljimi plastmi fliša. Ta domneva sloni na zelo majavih nogah, saj ocenjujejo, da 1000 m debeli flišni sedimenti v pazinskem bazenu predstavljajo popolno prepreko za vode iz Čičarije in Učke (Ivkovič in sod. 1983). Kljub temu so, med ugotavljanjem globine

zakraselosti na Nikšičkem polju, odkrili vodo 1500 m, v Ravnih Kotarih pa 2000 m pod morsko gladino (Ivkovič in sod. 1983).

Sobivanje obeh novih vrst z *N. spinulifemur* nam ponuja zanimivo možnost testiranja izolacije obeh prostorov. Če obstajata ločena vodna sistema, vsak s svojo vrsto, potem predvidoma obstajajo tudi razlike med *N. spinulifemur* v teh dveh sistemih.

Poleg vsega zgoraj naštetega obstaja tudi možnost, da je klad B v resnici kompleks dveh vrst, ki sta nastali po cepitvi kladov A in B in ju, z uporabljenimi metodami, preprosto nismo zaznali. Tej domnevi v prid morda govori morfološka, molekulska in geografska heterogenost klada B. Ker sta vrsti mlajši, bi lahko obseg genskega pretoka bolje ocenili z bolj variabilnimi zaporedji DNA. Obstoj severne in južne vrste znotraj klada B bi močno poenostavil razumevanje geografske razširjenosti.

Zapleten vzorec razširjenosti odpira zanimiva vprašanja o poteku in vzrokih speciacije ter ponuja *N. krameri* kot dober model za preučevanje evolucijskih procesov. Tudi molekulske raziskave drugih pripadnikov podzemne vodne makrofavne, kot sta na primer močeril *Proteus* (Gorički 2006) in jamska kozica *Troglocaris* (Zakšek in sod. 2009), prav v Istri izkazujejo veliko raznolikost in zapletene geografske vzorce. To dejstvo postavlja istrski polotok za izjemno zanimiv evolucijski poligon.

5 SKLEPI

- Filogenetske analize zaporedij 28S rRNA, COI in ITS kažejo, da je *N. krameri* monofiletska skupina, ki vsebuje dva klada.
- Klad A združuje populacije v pazinskem flišnem bazenu, ki morfološko ustrezano pazinski rasi. Klad B sestavlja populacije iz zaledja Tržaškega zaliva, Slovenskega Primorja, Čičarije in južnega obrobja pazinskega flišnega bazena, ki morfološko ustrezano tržaški in čičarijski rasi.
- Klada sta morfološko prepoznavna na osnovi vzorca ščetin na karpalnem členu drugega gnatopoda (GII/5). Pri kladu A so tam prisotne dodatne ščetine, pri kladu B pa dodatnih ščetin ni.
- Areala kladov sta simpatrična. Manjši in enotnejši areal klada A se zdi ugnezden v večji in bolj razčlenjen areal klada B.
- Klad A je tudi morfološko in molekulsko enotnejši od klada B.
- Populacije klada A in klada B imajo izolirane genske sklade in jih je treba povzdigniti na raven vrste. *N. krameri* je torej kompleks dveh vrst, od katerih je treba klad B na novo formalno opisati.
- Na podlagi razpoložljivih podatkov ne moremo podati jasnih zaključkov o poteku in vzrokih speciacije znotraj kompleksa *N. krameri*.

6 POVZETEK

V podzemnih in površinskih vodah Istre živi istrska slepa postranica *Niphargus krameri* Schellenberg. Taksonomske raziskave teh živali imajo že dolgo zgodovino in so poučen primer intenzivno proučevane "vrste", katere taksonomija se je razkrivala sorazmerno s količino vloženega dela. V nedavni raziskavi so med *N. krameri* prepoznali tri geografsko dobro ločene morfotipe, ki jih je mogoče ločiti po vzorcu ščetin na gnatopodih odraslih osebkov. Opisali so jih kot pazinsko, tržaško in čičarijsko morfološko raso. Namen diplomske naloge je preveriti ali obstajajo razlike tudi na molekulske ravni.

V analizo smo vključili 42 osebkov *N. krameri* iz 23 lokalitet, pri čemer smo, kjer je bilo mogoče, iz vsake lokalitete analizirali po dva osebka. Osebke smo morfološko pregledali in jih, glede na vzorec ščetin na gnatopodih, razvrstili v eno od treh morfoloških ras. Sledila je izolacija DNA in pomnoževanje odsekov genov za 28S rRNA, COI in ITS v verižni reakciji s polimerazo (PCR). Po čiščenju produktov PCR in določanju nukleotidnih zaporedij smo nadaljevali s filogenetskimi analizami. Po metodi največjega verjetja in z Bayesovim pristopom smo analizirali zaporedja 28S rRNA in COI vseh v analizo vključenih osebkov ter zaporedja ITS 5 osebkov iz 5 lokalitet.

Filogenetske analize so pokazale, da je *N. krameri* monofiletska skupina, znotraj katere obstajata dva dobro ločena klada. Klad A združuje populacije v pazinskem flišnem bazenu, ki morfološko ustrezano pazinski rasi. Klad B sestavlja populacije iz zaledja Tržaškega zaliva, Slovenskega Primorja, Čičarije in južnega obroba pazinskega flišnega bazena, ki morfološko ustrezano tržaški in čičarijski rasi. Ujemanje molekulskih in morfoloških podatkov priča o izoliranosti genskih skladov obeh skupin populacij *N. krameri*. Predlagamo, da se *N. krameri* obravnava kot kompleks dveh vrst, od katerih je treba eno na novo formalno opisati.

Simpatričnost arealov novih vrst odpira zanimiva vprašanja o poteku in vzrokih speciacije. Današnjo razširjenost bi lahko razložili z ekološko speciacijo, z alopatrično speciacijo s kasnejšimi migracijami ter posledično simpatrijo in z alopatrično speciacijo v še danes ločenih prostorih. Plejada možnosti ponuja *N. krameri* kot dober model za preučevanje evolucijskih procesov, istrski polotok pa, glede na podobno situacijo pri rodovih *Proteus* in *Troglocaris*, za izjemno zanimiv evolucijski poligon.

7 VIRI

- Bat L., Akbulut M., Sezgin M., Culha M. 2001. On the occurrence of *Niphargus valachicus* Dobrenau & Manolache, 1933 (Amphipoda, Gammaridae) in the Western Black Sea Region of Turkey. Turkish Journal of Zoology, 25: 235–239
- de Queiroz K. 2005a. A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. Proceedings of the California Academy of Sciences, 56: 196–215
- de Queiroz K. 2005b. Ernst Mayr and the modern concept of species. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102: 6600–6607
- Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research, 32(5): 1792–97
- Fišer C., Sket B., Stoch F. 2006. Distribution of four narrowly endemic *Niphargus* species (Crustacea: Amphipoda) in the western Dinaric region with description of a new species. Zoologischer Anzeiger, 245: 77–94
- Fišer C., Sket B., Trontelj P. 2008. A phylogenetic perspective on 160 years of troubled taxonomy of *Niphargus* (Crustacea: Amphipoda). Zoologica Scripta, 37: 665–680
- Fišer C., Zagmajster M. 2009. Cryptic species from cryptic space: the case of *Niphargus fongi* sp. n. (Crustacea, Amphipoda, Niphargidae). Crustaceana, 82: 593–614
- Fišer C., Trontelj P., Luštrik R., Sket B. 2009. Toward a unified taxonomy of *Niphargus* (Crustacea: Amphipoda): a review of morphological variability. Zootaxa, 2061: 1–22
- Fišer C., Konec M., Kobe Z., Osanič M., Gruden P., Potočnik H. 2010. Conservation problems with hypotherminorheic *Niphargus* species (Amphipoda: Niphargidae). Aquatic conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, 20: 602–604
- Flot J.F., Wörheide G., Dattagupta S. 2010. Unsuspected diversity of *Niphargus* amphipods in the chemoautotrophic cave ecosystem of Frasassi, central Italy. BMC Evolutionary Biology, 10: 13 pg.
- Fourmanet M., Gibbs M. 2006. PATRISTIC: a program for calculating patristic distances and graphically comparing the components of genetic change. BMC Evolutionary Biology, 6: 1

- Futuyma D.J. 2009. Evolution. 2nd ed. Sunderland, MA, U.S.A.. Sinauer Associates: 633
- Gorički Š. 2006. Filogeografska in morfološka analiza populacij močerila (*Proteus anguinus*). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 76 str.
- Guindon S., Gascuel O. 2003. PhyML - A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5): 696–704
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41: 95–98
- Holsinger J.R. 2000. Ecological derivation, colonization and speciation. V: *Ecosystems of the world, Subterranean Ecosystems*. Wilkens H., Culver D.C., Humphreys W.F. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science: 399–415
- Ivković A., Šarin A., Komatina M. 1983. Tolmač za hidrogeološko karto SFR Jugoslavije 1 : 500 000. Zvezni geološki zavod, Beograd.
- Jugovic J., Prevorčnik S., Blejec A., Sket B. 2011. Morphological differentiation in the cave shrimps *Troglocaris* (Crustacea, Decapoda: Atyidae) of the Dinaric karst – a consequence of geographical isolation or adaptation? *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*: 11 pg., [in press]
- Karaman G.S. 1984. Contribution to the knowledge of the Amphipoda 148. *Niphargus krameri* Schell. and *N. spinulifemur* S. Karaman in Southern Europe. *Bulletin du Muséum d' Historie Naturelle B*, 39: 85–104
- Karaman G.S. 1986. First discovery of genus *Niphargus* Sch. In Iraq, Israel and adjacent regions, with description of *N. itus*, new species (fam. Niphargidae) (Contribution to the knowledge of Amphipoda 195). *Poljoprivreda I Šumarstvo*, 35: 13–28
- Karaman G.S., Ruffo S. 1986. Amphipoda: *Niphargus* – group (Niphargidae sensu Bousfield, 1982). V: *Stygofauna Mundi*. Botosaneanu L. (eds.). Leiden: E. J. Brill / Dr Backhuys: 514–534
- Karaman S. 1954. Die Niphargiden des slovenischen Karstes, Istriens sowie des Benachb. Italiens. *Acta Musei Macedonici Scientiarum Naturalium*, 2: 159–180

- Kumar S., Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted)
- Lefébure T., Douady C.J., Gouy M., Trontelj P., Briolay J., Gibert J. 2006a. Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments. *Molecular Ecology*, 15: 1797–1806
- Lefébure T., Douady C.J., Gouy M., Gibert J. 2006b. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 435–447
- Lefébure T., Douady C.J., Malard F., Gibert J. 2007. Testing dispersal and cryptic diversity and dynamic in a widely distributed groundwater amphipod (*Niphargus rhenorhodanensis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 676–686
- Mathieu J., Jeannerod F., Hervant F., Kane T.C. 1997. Genetic differentiation of *Niphargus rhenorhodanensis* (Amphipoda) from interstitial and karst environments. *Aquatic Sciences*, 59: 39–47
- Mayden R.L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. V: Species. *The Units of Biodiversity*. Claridge M.F., Dawah H.A., Wilson M.R. (eds.). Chapman & Hall: 381–424
- Placer L., Vrabec M., Celarc B. 2010. Osnove razumevanja tektonske zgradbe NW Dinaridov in polotoka Istre. *Geologija*, 53/1: 55–86
- Proudlove G.S., Wood P.J., Harding P.T., Horne D.J., Knight L.R. F. D. 2003. A review of the status and distribution of the subterranean aquatic Crustacea of Britain and Ireland. *Cave and Karst Science*, 30: 53–74
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253–1256
- Rambaut, A. 2006. FigTree v1.3.1. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–1574

- Ruffo S. 1953. Lo stato attuale delle conoscenze sulla distribuzione geografica degli Anfipodi delle acque sotteranee europee e dei paesi mediterranei. Premier Congrès International de Spéléologie Paris, 3: 13–37
- Schellenberg A. 1935. Schlüssel der Amphipodengattung *Niphargus* mit Fundortangaben und mehreren neuen Formen. Zoologischer Anzeiger, 111: 204–211
- Schellenberg A. 1936. Bemerkungen zu meinem *Niphargus*-Schlüssel und zur Verbreitung und Variabilität der Arten, nebst Beschreibung neuer *Niphargus*-Formen. Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin, 22: 1–43
- Schlüter D. 2000. Ecological character displacement in adaptive radiation. The American Naturalist, 156: 4–16
- Schlüter D. 2009. Evidence for ecological speciation and its alternative. Science, 323: 737–741
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Annals of the Entomological Society of America 87: 651–701
- Sites J.W., Crandall K.A. 1997. Testing species boundaries in biodiversity studies. Conservation Biology, 11: 1289–1297
- Sket B. 1999a. High biodiversity in hypogean waters and its endangerment – the situation in Slovenia, the Dinaric karst and Europe. Crustaceana, 72: 767–779
- Sket B. 1999b. The nature of biodiversity in hypogean waters and how it is endangered. Biodiversity and Conservation, 8: 1319–1338
- Trontelj P., Douady C.J., Fišer C., Gibert J., Gorički Š., Lefébure T., Sket B., Zakšek V. 2009. A molecular test for cryptic diversity in ground water: how large are the ranges of macro-stygobionts? Freshwater Biology, 54: 727–744
- Väinölä R., Witt J.D.S., Grabowski M., Bradbury J.H., Jażdżewski K., Sket B. 2008. Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. Hydrobiologia, 595: 241–255

Xia X., Xie Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. Journal of Heredity, 92: 371–373

Zakšek V., Sket B., Gottstein S., Franjević D., Trontelj P. 2009. The limits of cryptic diversity in groundwater: phylogeography of the cave shrimp *Troglocaris anophthalmus* (Crustacea: Decapoda: Atyidae). Molecular Ecology, 18: 931–946

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Cenetu Fišerju za vodenje skozi ves projekt in prijateljske pogovore o problemih biologije in življenja nasploh.

Najlepša hvala somentorici dr. Valeriji Zakšek za pomoč in koristne nasvete pri vseh korakih izdelave naloge in ker je bila, ne glede na svojo časovno stisko, vedno pripravljena pomagati.

Hvala prof. dr. Borisu Sketu in doc. dr. Simoni Prevorčnik za hiter in natančen pregled naloge.

Za uvajanje v laboratorijsko delo, delo z nukleotidnimi zaporedji in zabavne prve ure, se prav posebej zahvaljujem Ajdi Moškrič.

Prijetno in sproščeno delovno vzdušje preteklih dveh let so ustvarili Teo Delić, Maja Zagmajster, Gregor Bračko, Meta Konec, Tjaša Lokovšek, Jure Jugovic, Martin Turjak in Peter Trontelj, za kar se jim najlepše zahvaljujem.

Zahvaljujem se tudi Jerneju Erkerju za pomoč in družbo na tridnevnom lovu na istrske postranice.

Hvala celi družini in vsem prijateljem, ki so tekom študija sprejemali izbruhe navdušenja in trenutke poklapnosti.

PRILOGA A

Seznam lokalitet molekulsko analiziranih osebkov *Niphargus krameri*.

Pri kodah osebkov znak " / " ločuje sinonimne kode. V oklepajih poleg kode osebkov je označena tudi morfološka rasa osebka (P – pazinska, T – tržaška, Č – čičarijska), kjer jo je bilo mogoče preveriti. Koordinate so podane v Gauss – Kruegerjevem geografskem sistemu kodiranja.

- 1 – potoček ob vhodu v tunel Valeta s Portoroške strani, Portorož, Slovenija
nabрано 22. 3. 2010, leg.: Ž. Fišer, koda osebkov: N0592 (T), N0593 (T)
koordinate: x – 5042316, y – 5390949
- 2 – potok v grapi 500 m Z od vasi Kolomban/Colombano, potok teče v Zatok svetega Jerneja/Baia di san Bartolomeo, Hrvatini, Slovenija
nabрано: 22. 3. 2010, leg.: Ž. Fišer, koda osebkov: N0590 (T), N0591 (T)
koordinate: x – 5050598, y – 5402406
- 3 – Ocizelska jama, Ocizla, Kozina, Slovenija
nabрано: 5. 1. 2008, leg.: S. Prevorčnik, koda osebkov: N0512, N0594 (T)
koordinate: x – 505033, y – 5414229
- 4 – jama Dimnice, Markovčina, Slovenija
nabрано: ?, leg.: C. Fišer, koda osebkov: N0041/V3
koordinate: x – 5047040, y – 5425450
- 5 – jama Kubik, Brezovica pri Gradinu, Gračišče, Slovenija
nabрано: 21. 10. 2010, leg.: V. Zakšek, koda osebkov: N0635 (T), N0636 (T)
koordinate: x – 5034755, y – 5410535
- 6 – jarek sredi polja teče v potok Bračana, S od ceste med vasjo Podrečak in vasjo Škuljari, 1 km JZ od Podrečaka, Buzet, Hrvaška
nabрано: 8. 10. 2010, leg.: Ž. Fišer, koda osebkov: N0607 (P), N0608 (P)
koordinate: x – 5032064, y – 5417004
- 7 – potok (pritok Mirne) ob cesti med zaselkom Kajini in zaselkom Mala Huba, 1 km SZ od Male Hube, Buzet, Hrvaška
nabрано: 8. 10. 2010, leg.: Ž. Fišer, koda osebkov: N0609 (P), N0610 (P)
koordinate: x – 5030878, y – 5418071
- 8 – Jama kod Rašpora, Rašpor, Buzet, Hrvaška
nabрано: 13. 10. 2009, leg.: B. Sket, koda osebkov: N0597 (Č), N0598 (Č)
koordinate: x – 5033016, y – 5428182
- 9 – potok ob cerkvici v vasi Gornja Nugla, Roč, Hrvaška
nabрано: 5. 11. 2009, leg.: Ž. Fišer, koda osebkov: N0578 (Č)
koordinate: x – 5030344, y – 5424036

10 – luže, osušeno močvirje, ob cesti med vasjo Roč in vasjo Krkuž, 500 m SV od Roča,
Roč, Hrvaška

nabрано: 5. 11. 2009, leg.: Ž. Fišer, кода озебков: N0573 (P), N0574 (P)

координате: x – 5028509, y – 5425988

11 – kaptirani izvir, Ročko polje, Buzet, Hrvaška

nabрано: 27. 6. 2010, leg.: B. Sket, кода озебков: N0621 (P), N0622 (P)

координате: /

12 – Rabakova špilja, Ročko polje, Hrvaška

nabрано: 26. 11. 2010, leg.: V. Zakšek, кода озебков: N0666 (T), N0667 (T)

координате: x – 5025270, y – 5428230

13 – kanal z vodo ob železnici, pri železniškem prehodu med vasjo Mikuličići in Dolenjo
Vasjo, 500 m V od Mikuličićev, Lupoglav, Hrvaška

nabрано: 8. 10. 2010, leg.: Ž. Fišer, кода озебков: N0611 (P), N0612 (P)

координате: x – 5022114, y – 5431680

14 – potok pod mostom na cesti 1 km V od Motovuna, Motovun, Hrvaška

nabрано: 5. 11. 2009, leg.: Ž. Fišer, кода озебков: N0575 (P), N0576 (P)

координате: x – 5021305, y – 5408433

15 – potok Brestovac, 10 km SZ od Pazina, Hrvaška

nabрано: 30. 5. 2002, leg.: C. Fišer, кода озебков: N0039/D1

координате: /

16 – izvir Malenica, Grdoselski potok, v vasi Grdoselo, Pazin, Hrvaška

nabрано: 5. 11. 2009, leg.: Ž. Fišer, кода озебков: N0579 (P)

координате: x – 5015632, y – 5417233

17 – izvir pri vasi Brhaji (ležijo med vasjo Zarečje in Grdoselo), Pazin, Hrvaška

nabрано: 5. 11. 2009, leg.: Ž. Fišer, кода озебков: N0580 (P), N0581 (P)

координате: x – 5015632, y – 5417233

18 – kaptirani izvir, Čerišnjeva, Pazin, Hrvaška

nabрано: 25. 6. 2010, leg.: B. Sket, кода озебков: N0619 (Č), N0620 (Č)

координате: /

19 – pritok Fojbe, izliv pri Šestanih, Pazin, Hrvaška

nabрано: 10. 3. 2002, leg.: C. Fišer, кода озебков: N0040/A3/C3, N0596

координате: /

20 – špilja Piskavica, Gologorica, Cerovlje, Hrvaška

nabрано: 25. 6. 2010, leg.: B. Sket, кода озебков: N0617 (T), N0618 (T)

координате: x – 5013078, y – 5424602

21 – Boljunščica, tunel Čepić, Plomin, Hrvaška

nabрано: 25. 6. 2007, leg.: V. Zakšek, koda osebkov: N0511, N0595 (P)

koordinate: x – 5003218, y – 5434344

22 – izvir Malini, Plomin, Hrvaška

nabрано: 25. 6. 2010, leg.: B. Sket, koda osebkov: N0613 (Č), N0614 (T)

koordinate: /

23 – izvir Puć, Vošteni, Sv. Lovreč, Hrvaška

nabрано: 27. 6. 2010, leg.: B. Sket, koda osebkov: N0615 (T), N0616 (T)

koordinate: x – 5004246, y – 5404234

PRILOGA B

Seznam nukleotidnih zaporedij vrst rodu *Niphargus*, ki so bile vključene v filogenetske analize kot zunanjiki.

Neobjavljena nukleotidna zaporedja so predstavljena s kodami osebkov shranjenih na Katedri za zoologijo, objavljena nukleotidna zaporedja pa s številkami (accession number), pod katerimi so dostopne v spletni bazi GenBank.

VRSTA	TIP NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA		
	COI	28S	ITS
<i>N. hvarensis</i> cf. <i>mlini</i>	NA037	NA037	
<i>N. hvarensis</i> Karaman S.	NA038	NA038	
<i>N. dalmatinus</i> Schaferna	NA060	NA060	
<i>N. timavi</i> Karaman S.	NA190	NA126	
<i>N. stygius</i> Schiödte	NA646	NA123	
<i>N. pasquinii</i> Vigna - Taglianti	NA221	NA010	
<i>N. rhenorhodanensis</i> Schellenberg	EF025790.1*	NA104	
<i>N. virei</i> Chevreux	DQ064751.1°	NA003	
<i>N. hadzii</i> Rejic	NA082	/	
<i>N. factor</i> Sket & Karaman G.	/	NA078	
<i>N. balcanicus</i> Absolon	/	NA070	
<i>N. longiflagellum</i> Karaman S.	/	NA093	
<i>N. salonitanus</i> Karaman S.	/	NA053	
<i>N. dolichopus</i> Fišer, Trontelj & Sket	/	NA183	
<i>N. orcinus</i> Joseph	/	NA099	
<i>N. sphagnicolus</i> Rejic	/	NA035	
<i>N. illidzensis</i> Schaferna	/	NA084	
<i>N. vinodolensis</i> Fišer, Sket & Stoch	/	NA062	
<i>N. spinulifemur</i> Karaman S.	/	NA107	NA577, NA650, NA659
<i>N. tridentinus</i> Stoch	/	NA063	
<i>N. puteanus</i> Koch C.L.	/	NA066	
<i>N. scopicauda</i> Fišer, Coleman, Zagmajster, Zwittnig, Gerecke & Sket	/	NA026	
<i>N. bajuvaricus</i> Schellenberg	/	NA024	
<i>N. wolfi</i> Schellenberg	/	NA015	
<i>N. carniolicus</i> Sket	/	NA017	
<i>N. dimorphophorus</i> Stock & Gledhill	/	NA528	

*Lefébure in sod. 2007

°Lefébure in sod. 2006a

PRILOGA C

Seznam analiziranih osebkov *Niphargus krameri* po pripadnosti morfološki rasi in molekulskemu kladu.

P – pazinska rasa, T – tržaška rasa, Č – čičarijska rasa, N – rase ni mogoče ugotoviti

OSEBEK	RASA	KLAD
Brestovac_NA039	N	A
Šestani_NA040	N	A
Tunel Čepić_NA511	N	A
Roč_NA573	P	A
Roč_NA574	P	A
Motovun_NA575	P	A
Motovun_NA576	P	A
Grdoselo_NA579	P	A
Brhaji_NA580	P	A
Brhaji_NA581	P	A
Tunel Čepić_NA595	P	A
Šestani_NA596	P	A
Podrečak_NA607	P	A
Podrečak_NA608	P	A
Mala Huba_NA609	P	A
Mala Huba_NA610	P	A
Mikuličiči_NA611	P	A
Mikuličiči_NA612	P	A
Ročko polje_NA621	P	A
Ročko polje_NA622	P	A
Jama Dimnice_NA041	N	B
Ocizelska jama_NA512	N	B
Kolomban_NA590	T	B
Kolomban_NA591	T	B
Portorož_NA592	T	B
Portorož_NA593	T	B
Ocizelska jama_NA594	T	B
Malini_NA614	T	B
Vošteni_NA615	T	B
Vošteni_NA616	T	B
Špilja Piskavica_NA617	T	B
Špilja Piskavica_NA618	T	B
Jama Kubik_NA635	T	B
Jama Kubik_NA636	T	B
Rabakova špilja_NA666	T	B
Rabakova špilja_NA667	T	B
Gornja Nugla_NA578	Č	B
Jama kod Rašpora_NA597	Č	B
Jama kod Rašpora_NA598	Č	B
Malini_NA613	Č	B
Čerišnjevica_NA619	Č	B
Čerišnjevica_NA620	Č	B