

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tjaša LOKOVŠEK

**FILOGENIJA IN FILOGEOGRAFIJA PIJAVKE *Dina lineata* (Hirudinea) NA
DINARSKEM KRASU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PHYLOGENY AND PHYLOGEOGRAPHY OF LEECH *Dina lineata*
(Hirudinea) ON DINARIC KARST**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomske naloge imenovala doc. dr. Rudija Verovnika.

Mentor: doc. dr. Rudi Verovnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Boris Sket
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Član: doc. dr. Rudi Verovnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 19.06.2008

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Tjaša Lokovšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 575.8:591.9:595.14(043.2)=163.6
- KG pijavke, Dinarski kras, *Dina lineata*, filogenija, filogeografija
- AV LOKOVŠEK, Tjaša
- SA VEROVNIK, Rudi (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2008
- IN FILOGENIJA IN FILOGEOGRAFIJA PIJAVKE *Dina lineata* NA DINARSKEM KRASU
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP VIII, 63 str., 5 tab., 15 sl., 63 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Območje Dinarskega krasa poseljuje več podvrst progaste pijavke *Dina lineata*, med katerimi je v kraških vodah najbolj razširjena podvrsta *D. lineata dinarica*. Zaradi nejasnih odnosov med taksoni smo sorodstvene odnose med podvrstami progaste pijavke in sorodnimi taksoni ugotavljali na podlagi sekvenc mitohondrijskih genov za 12S rRNA in COI. Filogenetska analiza je pokazala, da je *D. lineata dinarica* monofiletska skupina populacij, katere areal sega preko Dinarskega krasa od Dalmacije na severozahodu do osrednje Grčije na jugovzhodu. Haplotipi *D. lineata dinarica* se razporejajo v tri klade, ki se z manjšimi odstopanji ujemajo z njihovo geografsko razporeditvijo. Prvi klad obsega haplotipe iz Dalmacije, Hercegovine in osrednje Bosne. V drugem kladu so združeni haplotipi iz osrednje Bosne in v tretjem kladi iz Makedonije, južne Srbije in Črne gore. Velika heterogenost in velike genetske razdalje med kladi znotraj te vrste nakazujejo morebitno kriptično speciacijo. S pomočjo ključa za razlago analize statistično značilnih razdalj v hierarhiji kladov na podlagi genov za 12S rRNA in COI smo ugotovili, da so monofiletske skupine haplotipov *D. l. dinarica* posledica alopatrične fragmentacije. Vzrok za slednjo bi bil lahko vezanost pijavk na sistem povodij, ki so v miocenu pokrivala večji del sedanjega areala *D. l. dinarica*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDK 575.8:591.9:595.14(043.2)=163.6

CX leeches, Dinaric karst, *Dina lineata*, phylogeny, phylogeography

AU LOKOVŠEK, Tjaša

AA VEROVNIK, Rudi (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2008

TI PHYLOGENY AND PHYLOGEOGRAPHY OF LEECH *Dina lineata*
ON DINARIC KARST

DT Graduation thesis (University studies)

NO VIII, 63 p., 5 tab., 15 fig., 63 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Four leech subspecies of *Dina lineata* are found on Dinaric karst, among which *D. lineata dinarica* is the most common. Due to unclear taxonomy within genus *Dina*, 12S rRNA and COI gene based phylogenetic analysis was applied, in order to describe the phylogenetic relations among Dinaric subspecies of *D. lineata*. Phylogenetic analysis indicated the species status for *D. lineata dinarica*, which areal extends from Dalmatia in the north-west to central Greece in the south-east. Haplotypes inside *D. l. dinarica* clade forms three separate clades, which mostly correspond to their geographic distribution. First clade therefore includes haplotypes from Dalmatia, Herzegovina and central Bosnia. Second clade includes haplotypes from central Bosnia and third clade combines haplotypes from Macedonia, southern Serbia and Montenegro. At the same time large genetic distances and heterogeneity indicate plausible cryptic speciation within clade *D. l. dinarica*. Phylogeographic analysis based on mitochondrial 12S rRNA and COI sequences suggested that monophyletic haplotype lineages within *D. lineata dinarica* clade are caused by allopatric fragmentation. The later might occurred during separation of large water systems which covered the Dinarids in Miocene.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO TABEL	VI
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PRILOG	VII
OKRAJŠAVE	VIII
1 UVOD	1
2 PREGLED LITERATURE	3
2.1 DRUŽINA ERPOBDELLIDAE	3
2.2 ERPOBDELLIDAE NA OBMOČJU DINARSKEGA KRASA	5
2.3 TAKSONOMSKA PROBLEMATIKA RODU <i>Dina</i> IN SORODNIH TAKSONOV	8
2.4 UPORABA MOLEKULARNE FILOGENIJE V SISTEMATIKI PIJAVK	9
2.5 FILOGEOGRAFIJA	11
2.6 SPECIACIJA V VODNIH OKOLJIH DINARSKEGA KRASA	13
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI	15
3.1.1 Živali	15
3.1.2 Drugi materiali	19
3.2 METODE	21
3.2.1 Izolacija genomske DNA	21
3.2.2 Pomnoževanje v verižni reakciji s polimerazo (PCR)	22
3.2.3 Čiščenje produktov PCR	25
3.2.3.1 Čiščenje produktov PCR s pomočjo membranskega sistema	25
3.2.3.2 Čiščenje produktov PCR z elucijo	26
3.2.3 Sekvenčna analiza	27
3.2.4 Filogenetska analiza	28
3.2.5 Filogeografija	29
3.2.5.1 Mrežna analiza haplotipov	29
3.2.5.2 Hierarhična analiza kladov	30
4 REZULTATI	32
4.1 IZOLACIJA DNA IN POMNOŽEVANJE GENOV ZA 12S rRNA IN COI	32
4.2 SEKVENČNA ANALIZA, OBDELAVA SEKVENC IN FILOGENETSKA ANALIZA	32
4.3 FILOGEOGRAFSKA ANALIZA	39
4.3.1 Mrežna analiza haplotipov	39
4.3.2 Hierarhična analiza kladov	44
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	51
5.1 RAZPRAVA	51
5.1.1 Filogenetska analiza	51
5.1.2 Filogeografska analiza	54
5.2 SKLEPI	56
6 POVZETEK	58
7 VIRI	60

KAZALO TABEL

Tabela 1: Imena haplotipov pijavk	40
Tabela 2: Statistična značilnost geografskih vzorcev razporeditve haplotipov na podlagi gena 12S rRNA pijavk Hrvaške ter Bosne in Hercegovine, izražena kot vrednosti »p«	48
Tabela 3: Statistična značilnost geografskih vzorcev razporeditve haplotipov na podlagi gena 12S rRNA pijavk Srbije in Makedonije, izražena kot vrednosti »p«	48
Tabela 4: Zaporedje korakov v referenčnem ključu in ugotovljeni demografski dogodki na podlagi gena za 12S rRNA za statistično značilne geografske vzorce razporeditve haplotipov pijavk Hrvaške ter Bosne in Hercegovine	49
Tabela 5: Zaporedje korakov v referenčnem ključu in ugotovljeni demografski dogodki na podlagi gena za 12S rRNA za statistično značilne geografske vzorce razporeditve haplotipov pijavk Srbije in Makedonije	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz anulacije rodov <i>Erpobdella</i> , <i>Dina</i> in <i>Trocheta</i>	5
Slika 2: Območje razširjenosti vrst <i>Erpobdella octoculata</i> in <i>E. testacea</i>	6
Slika 3: Območje razširjenosti vrst <i>Erpobdella vilnensis</i> , <i>E. nigricollis</i> , <i>Dina cf. punctata</i> in <i>D. absoloni</i>	6
Slika 4: Območje razširjenosti vrst <i>D. lineata lineata</i> , <i>D. lineata lacustris</i> , <i>D. lineata dinarica</i> , <i>D. lineata montana</i> , <i>D. krasensis</i> , <i>Trocheta dalmatina</i> in <i>T. cf. cylindrica</i>	7
Slika 5: Lokacije vzorčnih mest pijavk, vključenih v raziskavo	15
Slika 6: Lise pomnoženih delov genov za 12S rRNA in COI sedmih pijavk	32
Slika 7: Drevo haplotipov pijavk na podlagi gena za 12S rRNA izdelanega po Bayesovi metodi	34
Slika 8: Drevo haplotipov pijavk na podlagi gena COI izdelanega po Bayesovi metodi	35
Slika 9: Drevo haplotipov pijavk sestavljenih zaporedij po Bayesovi statistiki	36
Slika 10: Vzočna mesta pijavk, glede na razporejanje njihovih haplotipov v klade na podlagi filogenetske analize.	39
Slika 11: Mrežna analiza skupine kladov na podlagi sekvenc genov za 12S rRNA	42
Slika 12: Mrežna analiza skupine kladov na podlagi sekvenc genov COI	43
Slika 13: Hierarhija kladov s 95% podporo za haplotipe iz Hrvaške ter Bosne in Hercegovine na podlagi gena za 12S rRNA	46
Slika 14: Hierarhija kladov s 95% podporo za haplotipe iz Srbije ter Makedonije na podlagi gena za 12S rRNA	47
Slika 15: Hierarhija kladov s 95% podporo za haplotipe iz Hrvaške na podlagi gena COI	50

KAZALO PRILOG

Priloga 1: Statistična analiza geografskih parametrov v kladih za 12SrRNA iz Srbije ter Makedonije	
Priloga 2: Statistična analiza geografskih parametrov v kladih za 12SrRNA iz Hrvaške ter Bosne in Hercegovine	

OKRAJŠAVE

bp	bazni par
CO I	prva podenota citokrom c oksidaze
dNTP	deoksi timidin trifosfat
EDTA	etilendiaminotetraična kislina
GTR	»general time-reversible« model nukleotidne substitucije
MCMC	»Markov Chain Monte Carlo«
mtDNA	mitohondrijska DNA
NJ	»neighbour joining« metoda rekonstrukcije dreves
PCR	verižna reakcija s polimerazo
rRNA	ribosomska RNA
TAE	tris-acetat-EDTA
TBR	metoda razreza in ponovnega združevanja
Tris	trihidroksietilaminoetan
Γ	gama porazdelitev

1 UVOD

Pijavke družine Erpobdellidae so pomemben del sladkovodne bentoške favne severne poloble (Trontelj in Sket 2000). Območje Dinarskega krasa naseljuje več taksonov iz družine Erpobdellidae, med katerimi je v kraških vodah verjetno najbolj razširjena morfološko opredeljena podvrsta *Dina lineata dinarica*. Ta poseljuje skoraj celotno območje Dinarskega krasa jugovzhodno od Slovenije in sega skoraj do Makedonije, medtem ko imajo druge podvrste *D. lineata* geografsko zelo omejena območja razširjenosti (Sket 1968).

Ločevanje taksonov na podlagi zunanjih morfoloških znakov, pigmentacije ter barvnih vzorcev in kasneje po zgradbi spolovil se je zaradi variabilnosti znakov pri družini Erpobdellidae pokazalo kot neučinkovito (Sket 1968), kar velja tudi v primeru vrst rodu *Dina*. Sorodstveni odnosi med vrstami in podvrstami v rodu *Dina* tako niso povsem pojasnjeni in zato je mogoče, da gre lahko v primeru podvrste *D. lineata dinarica* Sket 1968 bodisi za samostojno vrsto ali celo za skupek kriptičnih vrst.

Problematiko znotrajvrstnih odnosov, kjer so morfološke razlike zelo majhne, lahko bolj zanesljivo razjasnimo z uporabo molekularnih znakov. Zaradi številnih prednosti so med pogosteje uporabljenimi molekularno genetskimi metodami analiza zaporedij mitohondrijske DNA v kombinaciji z metodami, ki temeljijo na filogenetskih konceptih (Avice 2000).

Kljub visoki stopnji endemizma in veliki vrstni pestrosti vodnih organizmov na Dinarskem krasu je zgodovina geomorfoloških procesov in s tem procesov razširjanja vrst slabo raziskana. Ozadje razširjanja vrst lahko razjasnimo s filogeografsko analizo (Avice in sod. 1987). Pri njej s primerjavo geografskih podatkov in genetskih dreves primernih taksonov ugotavljamo statistično značilne povezave med geografijo in filogenijo ter skušamo razložiti demografske procese, ki so za te povezave odgovorni (Avice 2000).

Zaradi razširjenosti na dobršnem delu Dinarskega krasa bi lahko *D. lineata dinarica* služila tudi kot modelni organizem za razumevanje filogeografskih vzrocev razširjanja v vodnih okoljih Dinaridov.

V nalogi smo skušali:

- Ugotoviti filogenetske in filogeografske odnose med preiskovanimi populacijami pijavk iz celotnega območja razširjenosti *Dina lineata dinarica* na podlagi analize zaporedja nukleinskih kislin mitohondrijskih genov za 12S rRNA in COI,
- ugotoviti
 - ali je morfološko definirana podvrsta *Dina lineata dinarica* samostojna vrsta,
 - ali gre za skupek kriptičnih vrst,
- ugotoviti dejavnike, ki bi lahko vplivali na geografsko razporeditev haplotipov skupine *D. lineata dinarica*, ter primernost *D. lineata dinarica* kot modelnega organizma za ugotavljanje filogeografskih vzorcev sladkovodne favne na območju Dinarskega krasa.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 DRUŽINA ERPOBDELLIDAE

Pijavke družine Erpobdellidae so pomemben del sladkovodne bentoške favne severne poloble. Vsi predstavniki družine so plenilci, ki se hranijo predvsem z manjšimi nevretenčarji (Toman in Dall 1997). Pogosto so uporabljeni kot modelni organizmi v ekoloških študijah (Anholt 1986, Seaby in sod. 1995) in kot pomembni indikatorski organizmi v študijah onesnaženosti sladkovodnih sistemov (Wicklum in sod. 1997, McNicol in sod. 1997, Zaranko in sod. 1997).

Družino tvori devet rodov (Sidall 2002), od katerih je v Evropi prisotnih šest. Te morfološko ločimo po obliki telesa, anulaciji, položaju spolnih odprtin, velikosti, barvi in obliki vzorcev na površini telesa ter po anatomiji spolovil.

Taksonomija družine

classis HIRUDINEA

subclassis: EUHIRUDINEA

ordo: ARHYNCHOBDELLIDA

subordo: ERPOBDELLIFORMES

familia: Erpobdellidae

genera: *Dina**

*Trocheta**

*Erpobdella**

*Fadejewobdella**

*Archaeobdella**

*Croatobranthus**

Mooreobdella

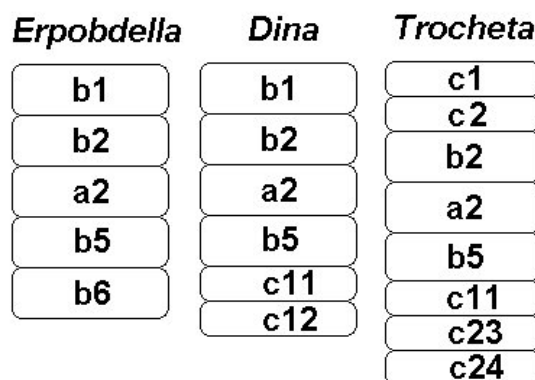
Nephelopsis

Motobdella

* - evropski rodovi

Rodova *Fadejewobdella* in *Archaeobdella* sta zastopana vsak le s po eno vrsto, obe pa sta omejeni na skrajni vzhodni rob Evrope. Tako je vrsta *Fadejewobdella quinqueannulata* (Lukin 1929) omejena na Ukrajino in južno Rusijo, vrsta *Archaeobdella esmonti* (Grimm 1876) pa je znana iz Kaspijskega in Azovskega morja, ustij Donave, Dnjepra, Dnjestra, Volge in Dona (Nesemann in Neubert 1999). *Croatobranhus mestrovi* Kerovec in sod. 1999 je edina vrsta v rodu. Vrsta je troglobiotska, najdena pa je bila globoko v jamah Velebita (Sket in sod. 2001). Za razliko od navedenih rodov pa preostali trije evropski rodovi v družini, *Erpobdella* Blainville 1918, *Dina* Blanchard 1892 in *Trocheta* Dutrochet 1817, sodijo med najbolj razširjene, številčne in vrstno bogate rodove sladkovodnih pijavk v Evropi (Nesemann in Neubert 1999). Med seboj se načeloma ločijo po anulacijskem vzorcu.

Pijavke rodu *Erpobdella* imajo na vsakem členu pet enako širokih obročkov (anulov): $b_1+b_2+a_2+b_5+b_6$, pri rodovih *Dina* in *Trocheta* pa so nekateri obročki razločno širši in se tekom dozorevanja še naknadno delijo (slika 1). Za rod *Dina* je značilna odebelitev vsakega petega obročka v vzdolžni smeri, medtem ko so ostali obročki enako veliki. Peti obroček je običajno dodatno predeljen s plitkimi brazdami (Nesemann in Neubert 1999) (slika 1). Pri rodu *Trocheta* je anulacija variabilna. Vsak člen je predeljen na osem ali več različno širokih obročkov. Prvi obroček je tako običajno deljen enkrat, peti obroček pa je naknadno razdeljen na tri obročke. Zaradi navedenih delitev obročkov je pri rodu *Trocheta* število teh veliko, njihovo število na člen telesa pa tako lahko variira od osem do enajst (Sawyer 1986). Poleg tega so pijavke rodu *Trocheta* praviloma tudi bolj čokate od sorodnih pijavk rodov *Dina* in *Erpobdella* (slika 1).



Slika 1: Shematski prikaz anulacije rodov *Erpobdella*, *Dina* in *Trocheta* (Trontelj in Sket 2000)

2.2 DRUŽINA ERPOBDELLIDAE NA OBMOČJU DINARSKEGA KRASA

Območje Dinarskega krasa naseljuje več taksonov iz rodov *Dina*, *Erpobdella* in *Trocheta*. Vrsta *Erpobdella octoculata* (Linne 1758) je v ravninah severne in severo-vzhodne Slovenije verjetno precej razširjena. V osrednjih delih Dinarskega krasa se vrsta pojavlja raztreseno, medtem ko je vzdolž Jadranske obale ni (Slika 2). Vrsta je evrivalentna in jo najdemo v vseh tipih voda (Sket 1968). Vrsta *Erpobdella testacea* (Savigny 1822) ima podobno razširjenost kot *E. octoculata*, le da je nekoliko redkejša in tudi bolj občutljiva na kakovost vode. Kljub temu pa je naselila nekatera območja, kjer *E. octoculata* ne najdemo, na primer Jadransko obalo in visokogorska jezera Črne gore in Makedonije (Sket 1968) (Slika 2). Vrsta *Erpobdella vilnensis* (Liskiewicz 1925) je prisotna v Muri in na posameznih lokalitetah v Makedoniji (Slika 3), medtem ko na Dinarskem krasu ni bila najdena (Sket 1968). Podobno velja tudi za vrsto *Erpobdella nigricollis* (Brandes 1900), ki je po vsej verjetnosti razširjena v Panonskem nižavju, v Sloveniji pa je poznano le nahajališče v okolici Brežic (Sket 1968) (Slika 3). Vrsta *Trocheta cf. cylindrica* Örley, 1886 (sinonim *Trocheta bykowskii*) je omejena na severo-zahodni rob Dinarskega krasa in predalpski del Slovenije (Sket 1968) (Slika 4), vrsta *Trocheta dalmatina* (Sket 1968) pa na območje med Dubrovnikom in Kotorjem, kjer je prisotna v maloštevilnih populacijah (Sket 1968) (Slika 4).

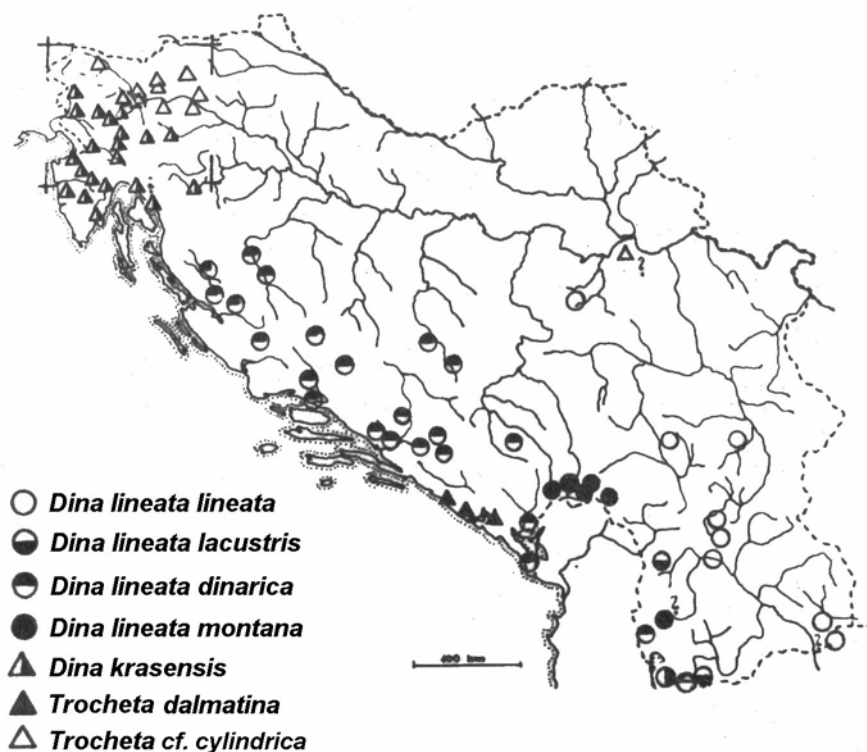


Slika 2: Območje razširjenosti vrst *Erpobdella octoculata* in *E. testacea* (po Sket 1986)



Slika 3: Območje razširjenosti vrst *Erpobdella vilnensis*, *E. nigricollis*, *Dina cf. punctata* in *D. absoloni* (prirejeno po Sket 1986)

Vrsta *Dina absoloni* Johansson 1913 je poznana iz večih lokalitet na jugovzhodu Dinarskega krasa, kjer živi v različnih jamskih vodah (Sket 1968), vrste *Dina cf. punctata* Johansson 1927 pa po vsej verjetnosti na Dinarskem krasu ni, saj je edini verjetni podatek le iz spodnjega toka Rižane (Sket 1968) (slika 3). Prav tako na Dinarskem krasu ni podvrste *Dina lineata lineata* (O. F. Muller 1774), ki poseljuje nižinska in predgorska območja južne Srbije ter jugovzhodni del Makedonije (slika 4), kot tudi ni podvrste *Dina lineata lacustris* Sket 1968, ki je bila najdena je v visokogorskih jezerih Šare v Srbiji in Pelistra v Makedoniji (Sket 1968) (slika 4). Na podoben habitat kot *D. l. lacustris* je vezana tudi podvrsta *Dina lineata montana* Sket 1968, ki pa poseljuje visokogorska jezera in mlake Prokletij in sosednjega hribovja (Sket 1968) (slika 4).



Slika 4: Območje razširjenosti vrst *D. lineata lineata*, *D. lineata lacustris*, *D. lineata dinarica*, *D. lineata montana*, *D. krasensis*, *Trocheta dalmatina* in *T. cf. cylindrica* (prirejeno po Sket 1986)

Dina lineata dinarica Sket 1968 je najbolj razširjen takson v kraških vodah Dinarskega krasa jugovzhodno od meja Slovenije, saj poseljuje območje Like, Dalmacije, preko Črne gore in vse do Makedonije (slika 4). Živi skoraj v vseh tipih voda, od bistrih izvirov do močnejše onesnaženih vod, kot so na primer napajalna korita, redkeje pa jo najdemo v jamah (Sket 1968). Na severozahodni meji areala jo nadomesti vrsta *Dina krasensis* (Sket 1968) (Trontelj in Sket 2000), ki pa je omejena na bistveno manjše območje kot *D. lineata dinarica*. Najdena je bila le na Dinarskem krasu Slovenije, v Istri in zahodni Hrvaški (Trontelj in Sket 2000).

Rod *Dina* na območju Balkana dopolnjujejo endemne vrste in podvrste, kot so *Dina lineata lacustris* Sket 1968 z Belega jezera v Makedoniji, *Dina latestriata* Neubert in Nesemann 1999 iz Prespanskega jezera ter *D. ohridana* Sket 1968, *D. lepinja* Sket, Šapkarev 1986, *D. krilata* Sket 1989, *D. svilesta* Sket 1989, *D. eturpshem* Sket 1989, *D. lyhnida* Šapkarev 1990, *D. kuzmani* Šapkarev 1990 in *D. profunda* Šapkarev 1990 iz Ohridskega jezera in njegovih pritokov.

2.3 TAKSONOMSKA PROBLEMATIKA RODU *Dina* IN SORODNIH TAKSONOV

Ločevanje taksonov na podlagi zunanjih morfoloških znakov, pigmentacije in barvnih vzorcev, se je pri družini Erpobdellidae kmalu pokazalo kot neučinkovito, saj je večina teh znakov homoplastičnih. Poleg tega so omenjeni znaki odvisni še od metod obdelave materiala, kot je na primer način fiksacije vzorcev. Nekatera odstopanja pa so se pokazala tudi pri obliki anulacije (Sket 1968). Pomanjkanje zunanjih morfoloških znakov je raziskovalce konec prve polovice prejšnjega stoletja prisililo k iskanju zanesljivejših taksonomskih znakov v notranjosti telesa. Po analogiji z drugimi živalskimi skupinami so primerne znake iskali v zgradbi spolovil (Moore 1912, Pawlovski 1948, Soos 1966, Sket 1968, Nesemann in Neubert 1999), ki pa so se prav tako izkazali kot nezanesljivi, saj so lahko v nekaterih primerih odvisni od individualne in ne geografske variabilnosti, oblika in

velikost spolovil pa se lahko spreminja tudi sezonsko in v odvisnosti od fiziološkega stanja živali (Sket 1968).

Pomanjkanje zanesljivih taksonomskih znakov je bilo vzrok številnim težavam pri ločevanju predstavnikov družine Erpobdellidae, zlasti rodov *Erpobdella*, *Trocheta* in *Dina*. Določene nejasnosti pri razvrščanju v omenjene taksone so se začele že s samim opisom rodu *Dina* konec 19. stoletja (Blanchard 1892) in njegovim ločevanjem od predstavnikov rodu *Erpobdella* (Moore 1912, Pawlowski 1955). Poleg tega je Perret (1952) v severnoafriškem materialu odkril obstoj populacije pijavk, pri katerih ni povsem jasno, ali pripadajo rodu *Dina* ali rodu *Trocheta*. Podoben primer so bile tudi pri nas živeče populacije vrste *Trocheta bykowskii krasensis*, pri katerih je anulacija kazala značilnosti kot pri ostalih predstavnikih rodu *Trocheta*, oblika spolovil pa je bila skoraj identična kot pri podvrsti *Dina lineata dinarica* (Sket 1968). Za problematične so se na območju Dinarskega krasa izkazale tudi populacije predstavnikov družine Erpobdellidae, ki imajo na zadnjem delu telesa obročke b6 naknadno razdeljene na dva, občasno pa celo v tri manjše obročke in pri katerih tradicionalna uvrstitev v rod sploh ni bila možna (Sket 1968).

2.4 UPORABA MOLEKULARNE FILOGENIJE V SISTEMATIKI PIJAVK

Problematiko odnosov med taksoni, kjer so morfološke razlike večinoma zelo majhne, lahko veliko bolj zanesljivo razjasnimo z uporabo ustreznih molekularnih znakov, med katerimi se najpogosteje uporablja sekvenčna analiza primernih zaporedij DNA (Avice 2000). Zaradi primerne dolžine, prisotnosti evolucijsko ohranjenih in variabilnih delov gena, ter nekatih drugih lastnosti so se v filogenetskih študijah najbolje izkazali geni, povezani z univerzalnimi življenjskimi procesi, kot sta na primer sinteza proteinov in celično dihanje (Dover in Tautz 1986).

Tako so se v filogenetskih in filogeografskih analizah kot zelo primerni izkazali jedrni geni za 5,8S, 28S in 18S rRNA (Medlin in sod. 1988, Steinbrück in sod. 1991) ter nekodirajoča intragenska regija med genoma za 5,8S in 28S rRNA (ITS2) (Schlötterer in sod. 1994), zlasti pa mitohondrijski geni, kot sta gen za 12S rRNA in gen encima dihalne verige citokrom-oksidaža I (COI) (Avice 2000). Prednost mitohondrijske DNA pred jedrno je zlasti v klonalnem načinu dedovanja in s tem posledično v odsotnosti rekombinacije. Spreembe genetskega zapisa so tako izključno posledica vertikalno prenesenih mutacij, kar omogoča bolj jasen vpogled v sorodstvene odnose med osebki. Poleg tega je mitohondrijska DNA bolj podvržena mutacijam in ima zato večjo hitrost evolucije, zaradi česar so mitohondrijski geni primernejši za ugotavljanje filogenetskih odnosov med zelo sorodnimi taksoni in so med najpogosteje uporabljenimi molekularnimi markerji v filogenetskih študijah (Avice 2000, Freeland 2005). Na podlagi sekvenc mitohondrijske DNA je mogoče s kombinacijo filogenetskih metod in hierarhične analize kladov ugotavljati sorodstvene odnose med populacijami ter vpliv zgodovinske komponente (kolonizacije, ekspanzije, fragmentacije) in recentnega genetskega pretoka na odnose med populacijami.

Nekateri sorodstveni odnosi med višjimi taksoni pijavk so bili razjasnjeni šele z uporabo filogenetske analize zaporedij DNA, ki je potrdila tudi nezanesljivost morfoloških znakov znotraj družine Erpobdellidae (Trontelj in sod. 1996, 1999, Siddall in Burreson 1998, Govedich in sod. 1998, Apakupakul in sod. 1999, Trontelj in Sket 2000, Siddall 2002). V skladu z morfološko podprto domnevo Sketa (1968) sta restrikcijska (Trontelj in sod. 1996) in sekvenčna analiza gena za 18S rRNA in intragenske regije ITS2 (Trontelj in Sket 2000) potrdila ločen filogenetski položaj tedanjih podvrst *T. bykowskii bykowskii* in *T. bykowskii krasense*. Ugotovljena je bila celo bližnja sorodnost slednje s predstavnikom rodu *Dina*, zaradi česar se je pojavilo vprašanje monofilije rodov *Dina* in *Trocheta*. Sekvenčna analiza že omenjenih zaporedij (Trontelj in Sket 2000) je kasneje dokončno utemeljila preimenovanje *T. b. krasense* v *Dina krasensis* in pokazala potrebo po ukinitvi poddružine Trochetinae. Filogenetska analiza je tudi pokazala razvejitev evropskih predstavnikov družine Erpobdellidae na dva velika klada.

Prvega tvorijo vsi predstavniki rodu *Erpobdella*, uporabljeni v raziskavi, kar potrjuje monofilijo klada, drugi pa združuje predstavnike rodov *Dina* in *Trocheta*. Siddall (2002) je predlagal rešitev problema parafiletskega rodu *Dina*. V sekvenčno analizo je vključil tudi nekatere neevropske predstavnike družine Erpobdellidae. Na podlagi analize genov za 18S rRNA, 12S rRNA in COI je predlagal ukinitvev rodov *Dina*, *Mooreobdella*, *Nephelopsis*, *Croatobranhus* in *Trocheta* in njihovo preimenovanje v rod *Erpobdella*.

2.5 FILOGEOGRAFIJA

Filogeografija je panoga biogeografije, s katero pojasnujemo vzroke in procese, ki določajo geografsko razširjenost populacij znotraj vrst ali ozko sorodnih vrst (Avice in sod. 1987). S filogeografijo skušamo ugotoviti, kakšen vpliv na sedanjo razširjenost genetskih lastnosti organizmov imajo zgodovinski in demografski procesi v populacijah. Zato je treba v filogeografsko analizo vključiti znanja s področij molekularne genetike, demografije, etologije, paleontologije, filogenetske biologije, zgodovinske geografije in geologije (Avice 2000).

Osnovne enote v filogeografskih študijah so monofiletske skupine ali kladi, dobljene s filogenetsko analizo. Slednja lahko temelji na različnih molekularnih markerjih, zaradi že omenjenih prednosti (glej poglavje 2.4) pa so med najpogosteje uporabljemi segmenti mitohondrijske DNA (Avice 2000). Filogenetska drevesa neke skupine taksonov niso nujno enaka njihovim genetskim drevesom, kar velja zlasti v primerih evolucije genov med populacijami iste vrste. V genskih skladih populacij so lahko ob fragmentaciji hkrati prisotni novi haplotipi potomcev, kot še vedno prisotni haplotipi prednikov, med katerimi prihaja do rekombinacij. Za razliko od dihotomne topologije filogenetskih dreves lahko odnose in povezave med haplotipi populacij mnogo bolje predstavimo v obliki dreves s politomnimi razvejišči ali v obliki mrež (Posada in Crandall 2001).

Eden od temeljev uporabe mitohondrijske DNA v filogeografskih študijah je koalescenčna teorija. To je populacijski model nevtralne evolucije, po katerem vsi mitohondrijski haplotipi izvirajo iz skupnega prednika. Koalescenca je v osnovi model izločanja linij in genetskega drifta, ki poteka nazaj v preteklost in omogoča vpogled v pretekle dogodke, ki vodijo vse do skupnega prednika (Harding 1996). Bolj kot so si organizmi ali geni podobni, krajši je čas koalescence in s tem čas do skupnega prednika. Na čas koalescence vplivata zlasti velikost recentne populacije in pretekli demografski dogodki.

Geografsko razporeditev populacij skušamo v osnovi razlagati z dvema pojavoma. (I) Z vikarianco, procesom fragmentacije vrste z velikim arealom zaradi ekoloških dejavnikov. V tem primeru pride do izolacije genetskih skladov zaradi geografskih preprek. Z vikarianco dobimo ločene populacije z različnimi genetskimi skladi, ki se lahko razvijejo v samostojne vrste ali pa ponovno vzpostavijo stik. (II) Z disperzijo – pojavom razširjanja vrste iz ožjega območja na druga, za preživetje vrste primerna območja. V tem primeru pride do diferenciacije zaradi razvrščanja linij in genetskega drifta med disperzijo ter do izolacije zaradi razdalj. V evolucijskih procesih se oba pojava prepletata.

Med pogosteje uporabljenimi filogeografskimi pristopi je metoda hierarhične analize kladov (Templeton in sod. 1995, Templeton 1998), ki omogoča objektivno razlikovanje med alternativnimi hipotezami o geografski razširjenosti genetskih linij na nivoju populacij (Avice 2000). Gre za metodo, s katero lahko s primerjavo geografskih podatkov in genetskih dreves ugotovljamo statistično značilne povezave med geografijo in filogenijo ter skušamo razložiti demografske procese, ki so za te povezave odgovorni.

2.6 SPECIACIJA V VODNIH OKOLJIH DINARSKEGA KRASA

Vodna favna Dinarskega krasa je poznana po številnih endemnih vrstah in veliki vrstni pestrosti. Večina vrst je omejenih na ozka geografska območja, kjer poseljujejo različne tipe površinskih in podzemnih vod, od kraških izvirov, do ponikalnic in drugih oblik kraških vod. Med vrstno najbogatejšimi skupinami živali kraških vod z visokim številom endemnih vrst izstopajo zlasti skupine kot so postranice (Amphipoda), enakonožci (Isopoda) in ceponožci (Copepoda) med raki, krapovci (Cyprinidae) med ribami ter nekateri polži in pijavke iz družine Erpobdellidae. Kljub veliki vrstni pestrosti (Sket 1999, Culver in Sket 2000), pa so geomorfološki procesi in paleohidrološko ozadje speciacije v vodnih okoljih Dinarskega krasa slabo raziskani.

Poleg endemnih in geografsko omejenih vrst so v vodnih sistemih Dinarskega krasa prisotne tudi vrste, ki so sicer vezane na določen tip habitata, hkrati pa so razširjene v večjem delu Dinaridov. Takšna je na primer človeška ribica (*Proteus anguinus*) (Gorički in Trontelj 2006, Sket 1997), vodni osliček (*Asellus aquaticus*) (Verovnik in sod. 2004), jamske kozice iz rodu *Troglocaris* (Zakšek in sod. 2007), cevkar vrste *Marifugia cavatica* in pijavke vrste *Dina lineata* (Sket 1968). Rezultati nedavnih genetskih analiz kažejo, da gre v primeru naštetih vrst dejansko za skupke ločenih vrst (t.i. kriptične vrste). Tako je sekvenčna analiza izbranih zaporedij pri pijavki *D. lineata*, vodnemu osličku in človeški ribici nakazala izjemno visoko stopnjo izolacije med sosednjimi populacijami omenjenih vrst. Zaradi odsotnosti genskega pretoka med populacijami naj bi sčasoma prišlo do kriptične speciacije znotraj vrst, kar kažejo tudi nekateri rezultati sekvenčnih analiz (Trontelj in sod. 1996).

Glavni vzrok za izolacijo populacij omenjenih vrst po vsej verjetnosti leži v poteku paleogeografskih in hidrografskih dogodkov na območju Dinarskega krasa. Ob koncu oligocena je celotno območje današnjega Balkanskega polotoka razen nekaterih otokov prekrivalo morje (Capoa in Radoičić 2000 po Krstić in sod. 2003). V začetku miocena se je kopno Balkanskega polotoka pričelo dvigovati, morje pa

se je postopoma umikalo. Do sredine miocena so območja kopnega na območju Dinaridov morje omejila ter ga oblikovalna v kompleksen sistem somornih jezer, ki se je raztezal od Krete na jugovzhodu, na severozahodu pa se je Dinarski jezerski sistem raztezal globoko v zahodni Paratethys, severno od Alp (Krstić in sod. 2003). Obsežen sistem miocenskih jezer je omogočal povezave in genski pretok, njegovo umikanje pa je verjetno vodilo do številnih vzporednih vikariantnih dogodkov, ki so botrovali velikemu številu endemnih vrst in veliki vrstni pestrosti Dinarskega krasa.

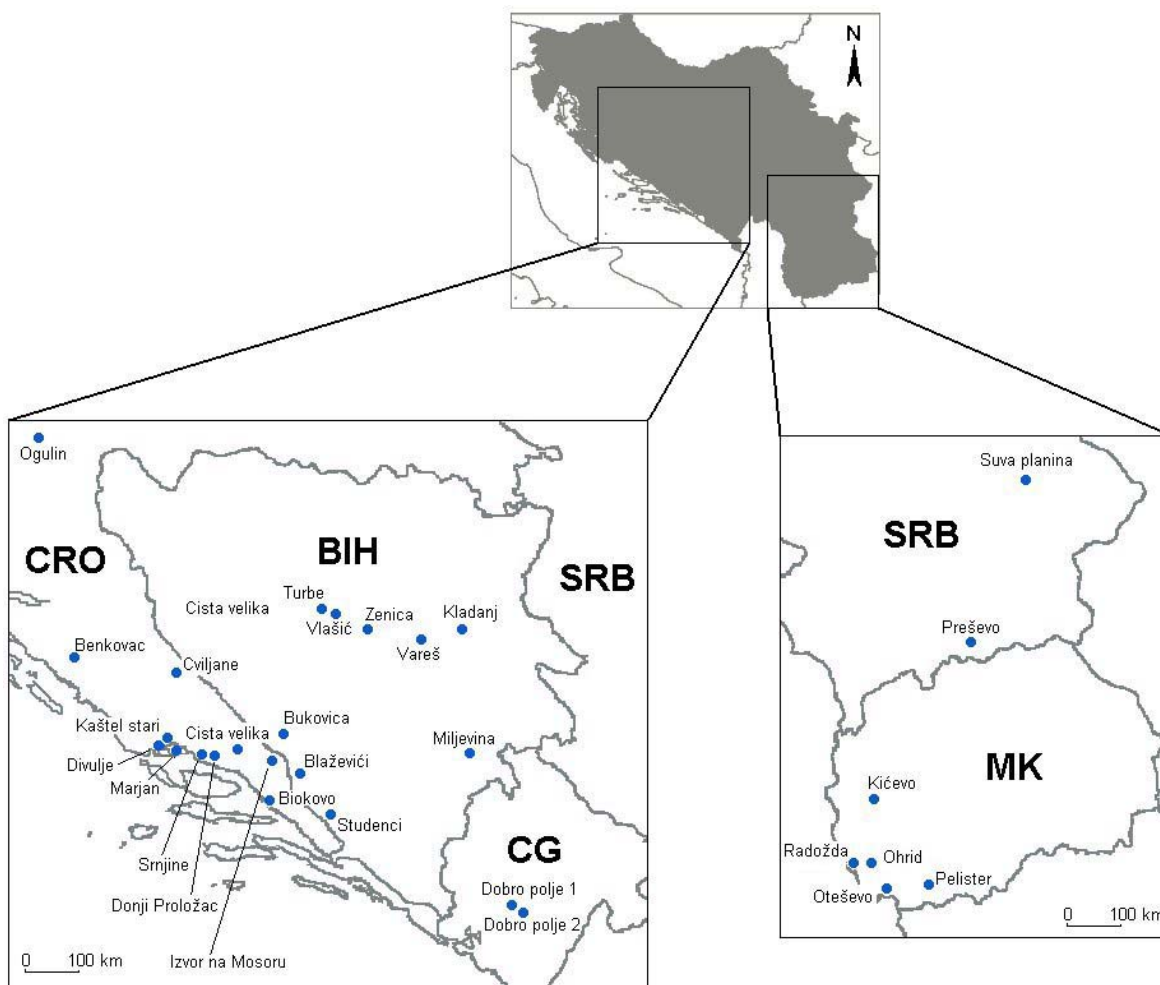
3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 ŽIVALI

V analizo smo vključili 115 primerkov pijavk, ki so po zunanji morfologiji ustrezali opisu podvrste *Dina lineata dinarica*. Vzorce so nabrali različni vzorčevalci na 32 lokalitetah (Silka 5). Poleg njih smo vključili sekvence potencialno ozko sorodnih pijavk, ki smo jih analizirali sami (*Trocheta cf. cylindrica*, *T. cf. dalmatina*, *Dina latestriata*, *D. profunda* in *D. absoloni*), ter kot zunanjike za koreninjenje dreves zaporedja pijavk *Erpobdella mexicana* (DQ2335585, DQ2335595) (Oceguera-Figueroa in sod., neobjavljeno), *E. testacea* (AF462025, AF462027) (Apakupakul in sod. 1998, Sidall 2001) in *E. octoculata* (AF099954, AF03274) (Trontelj 1998, Sidall in Burreson 1997), *D. lineata dinarica* (AF169369) (Trontelj in Sket 2000), *D. krasensis* (- / AF169373) (Trontelj in Sket 2000) in *D. lineata lineata* (AF099952) (Trontelj 1999), vse iz baze GenBank.

Vzorci, vključeni v raziskavo, so nabrali sodelavci Katedre za zoologijo in zunanji sodelavci v času med 15.06.1995 in 05.05.2006. Do izolacije DNA so bili shranjeni v 96% etanolu pri -20°C, v zbirki Katedre za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete.



Slika 5: Lokacije vzorčnih mest pijavk, vključenih v raziskavo. Približno mesto vzorčenja je označeno s piko.

Seznam lokalitet s kratkim opisom in kratico imena:

I - Izvir pod cerkvijo Stomarija, **Kaštel stari** (Kas) pri Splitu, Hrvaška
koordinate: 16° 19' 27,3"E / 43° 34' 11,4"N, leg.: C. Fišer

II - potok pod vasjo Studena, s.Čuklenik, Jelašnička klisura, **Suva planina** (Svp), Srbija
koordinate: 22° 5' 27,4"E / 43° 15' 39,1"N, leg.: H. Urbas & P. Presetnik

III - voda, ki teče iz vodnjaka v drenažni jarek, **Divulje** (Div), 4 km E Trogir, Hrvaška
koordinate: 16° 17' 48,7"E / 43° 32' 0,4"N, leg.: C. Fišer

IV - Izvirna jama Vrelo, pri gostilni Vrelo, **Turbe** (Tur), 4 km W Travnik, B i H
koordinate: 17° 35' 53"E / 44° 14' 35,5"N, leg.: P. Trontelj & S. Polak

- V** - Izvir Nele (1.izvir), **Civljane** (Civ), Vrlika, 20 km SE Knin, Hrvaška
koordinate: 16° 24' 20,7"E / 43° 57' 11,8"N, leg.: P. Trontelj
- VI** - Vrela voda, **Srinjine** (Sri), Mosor, 11km E Split, Hrvaška
koordinate: 16° 36' 10,1"E / 43° 29' 34,4"N, leg.: T. Rađa
- VII** - Šopot izvor, **Benkovac** (Ben), Hrvaška
koordinate: 15° 36' 7,7"E / 44° 1' 33,5"N, leg.: T. Rađa
- VIII** - Sveta Nedela; izvir in jezerska plitvina, pod kamni, **Radožda** (Rad), Ohrid, Mak.
koordinate: 20° 37' 54,2"E / 41° 6' 6,8"N, leg.: C. Fišer
- IX** - Prespansko jezero, pod kamni, 50 cm; med krajema **Oteševo** (Ote) in Stenje, Mak.
koordinate: 20° 53' 59,3"E / 40° 57' 30,1"N, leg.: B. Sket
- X** - Grudsko vrilo, 2 km E od Grude, izvir **Blaževići** (Grd), 14 km ESE Imotski, BiH
koordinate: 17° 22' 6,7"E / 43° 23' 23,7"N, leg.: B. Sket
- XI** - Malo jezero, pod kamni, **Pelister** (Pel), Makedonija
koordinate: 21° 11' 48,6"E / 40° 58' 34,4"N, leg.: R. Verovnik & P. Zupančič
- XII** - Vrlika - izvir pri Sekulovićih, S od Grbavcev, **Donji Proložac** (Pro), 5 km NWW Imotski, Hrvaška
koordinate: 17° 9' 37"E / 43° 27' 50,7"N, leg.: B. Sket
- XIII** - Izvor v Kašunih, **Marjan** (Mar), Split, Hrvaška
koordinate: 16° 24' 29,2"E / 43° 30' 36"N, leg.: T. Rađa
- XIV** - Kravica vodopad, na reki Trebižat, **Studenci** (Stu), 9 km WNW Čapljina, BiH
koordinate: 17° 36' 28,4"E / 43° 9' 21,3"N, leg.: R.Verovnik & P.Zupančič
- XV** - **Vareš** (Var), Potočič na Livadi, B i H
koordinate: 18° 19' 21,8"E / 44° 9' 11,4"N, leg.: R. Verovnik & P. Zupančič
- XVI** - Zeta, **Dobro polje 1** (Zet), Podgorica, Črna Gora
koordinate: 19° 1' 53,1"E / 42° 37' 52,2"N, leg.: P. Trontelj
- XVII** - jama Medvedica, **Ogulin** (Ogu), Hrvaška
koordinate: 15° 13' 25,8"E / 45° 16' 1,2"N, leg.: B. Jalžić

- XVIII** - Šopot izvor, **Benkovac** (Ben), Hrvaška
koordinate: 15° 36' 7,7"E / 44° 1' 33,5"N, leg.: B. Jalžić
- XIX** - Velika pečina, **Bukovica** (Buk), 12 km SSE Tomislav grad (Duvno), BiH
koordinate: 17° 15' 6"E / 43° 36' 42,9"N, leg.: T. Rađa
- XX** - reka Albarine, Bettant, Lyon, Francija
koordinate: 5° 22' 0"E / 41° 55' 60"N, leg.: B. Sket
- XXI** - izvir pri kraju Izvor, **Kičevo** (Kic), izvir Treske, Makedonija
koordinate: 20° 49' 37,8"E / 41° 28' 50"N, leg.: B. Sket
- XXII** - **Cista velika** (Cis), Trilj - Imotsko polje, 28 km WNW Imotski, Hrvaška
koordinate: 16° 52' 41,7"E / 43° 32' 7"N, leg.: B. Sket
- XXIII** - **Izvor na Mosoru** (Mos), mali izvir pri PD U.Girometta na Mosoru, Hrvaška
koordinate: 16° 41' 31,1"E / 43° 29' 20,6"N, leg.: T. Rađa
- XXIV** - Izvir pri Mlinih pri Zeti, **Dobro polje 2** (Dbp), Podgorica, Črna Gora
koordinate: 19° 4' 2,8"E / 42° 35' 57,5"N, leg.: P.Trontelj & S.Polak
- XXV** - Izvir ob cesti, tik pred smučiščem, **Vlašić** (Vls), 7 km N Travnik, BiH
koordinate: 17° 39' 60"E / 44° 17' 26,7"N, leg.: P. Trontelj & S. Polak
- XXVI** - Ledenjača, Donji Budanj, 4 km SE **Miljevina** (Mil), 6 km W Srbinje Foča), BiH
koordinate: 18° 41' 57,4"E / 43° 30' 3,4"N, leg.: P.Trontelj & S.Polak
- XXVII** - Izvor uz cestu, **Zenica** (Znc), BiH
koordinate: 17° 54' 41,9"E / 44° 11' 59,9"N, leg.: V. Karlo, T. Rađa
- XXVIII** - Jama iznad Saranaća, Šošići, **Biokovo** (Bio), 13 SE Makarska, Hrvaška
koordinate: 17° 9' 17"E / 43° 14' 19"N, leg.: V. Karlo, T. Rađa
- XXIX** - Gluha Bukovica jama, 4 km W **Kladanj** (Kld), BiH
koordinate: 18° 38' 47,7"E / 44° 12' 50,2"N, leg.: B. Jalžić
- XXX** - Vrelo pri Ilincih, **Preševo** (Pre), Srbija
koordinate: 21° 36' 9,8"E / 42° 21' 1"N, leg.: P. Trontelj & S. Polak
- XXXI** - **Ohrid** (Ohr), Makedonija
koordinate: 20° 47' 32,6"E / 41° 6' 56,9"N, leg.: B. Sket
- XXXII** - Pčinja, reka, **Katlanovska Banja** (Kab), Makedonija
koordinate: 21° 41' 49"E / 41° 53' 54"N, leg.: B. Sket

3.1.2 DRUGI MATERIALI

Kemikalije:

Oznaka in koncentracija

agaroz

mešanica dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

vsak po [2mM]

10 x PCR pufer z MgCl₂

voda (Mili Q)

ultračista voda, tridestilirana

Taq- polimeraza [5 U/μl]

etidijev bromid [2mg/ml]

marker (Gene Ruler™ 100 bp DNA)

proteinaza K

RNAza

Nemčija

bromfenol modro

pufer (TAE)

etanol, absolutni

aplikacijski pufer bromfenol modro[0,25%]

ksilen cianol FF [0,25%]

saharoza [40%]

1 x TAE

50 x TAE, pH 8,0 baza Tris [2mM]

ocetna kislina

EDTA [50mM]

komplet »GenElute Mammalian Genomic

DNA Miniprep Kit«

Sigma, St.Louis, ZDA

MBI Fermentas, Vilna, Litva

Biotechs, Španija

Millipore, Billerica, ZDA

Sigma, St.Louis, ZDA

Biotechs, Španija

Sigma, St.Louis, ZDA

MBI Fermentas, Vilna, Litva

Sigma, St.Louis, ZDA

Merck, Darmstadt,

Merck, Darmstadt, Nemčija

Merck, Darmstadt, Nemčija

Merck, Darmstadt, Nemčija

Merck, Darmstadt, Nemčija

Merck, Darmstadt, Nemčija

Merck, Darmstadt, Nemčija

Sigma, St.Louis, ZDA

Fluka, Švica

Merck, Darmstadt, Nemčija

Sigma, St.Louis, ZDA

Laboratorijska oprema:

tehtnica PG503-S

stresalnik MS2

membranski sistem

pipete (10-1000 μl)

mikrovalovna pečica Sfnatutto

transluminator

polaroidna kamera in objektiv

grelec z magnetnim mešalom Genesis

GenAmp PCR System 2400

GenAmp PCR System 2700

Mettler-Toledo, Greifensee,
Švica

Ika-Works, Willington, ZDA

Millipore Montagne, Bedford,
ZDA

Gilson , Middleton, ZDA

Eppendorf, Hamburg,

Nemčija

Delonghi, Italija

Vilber Lourmat, Francija

Polaroid, Cambridge, ZDA

Jencons, Velika Britanija

Applied Biosystems, Foster

City, ZDA

Applied Biosystems, Foster

City, ZDA

centrifuga -5417 R	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
visokonapetostni vir P25	Biometra, Göttingen, Nemčija
visokonapetostni vir P3000	Biorad, Hercules, ZDA
polariodna kamera	Polaroid
hladilnik	Gorenje
zamrzovalnik do -20°C	Gorenje
zamrzovalnik do -80°C	Gorenje
Potrošni material:	
rokavice iz lateksa	Safeskin Corp., San Diego, ZDA
papirnate brisače	Paloma, Slovenija
parafilm	Parafilm » M« , Chicago, ZDA
mikrocentrifugirke	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
nastavki za pipetiranje	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
rezila	Wilkinson, Velika Britanija
polaroidni film	Polaroid, Velika Britanija
vata	
pertijevke	
Programska oprema:	
Chromas Pro 1.33	Technelysium Pty Ltd 2005
BioEdit 5.0.9	Hall 1999
GEODIS 2.5	Posada in sod. 2000
DAMBE 4.5.2	Xia in Xie 2001
MEGA 3.1	Kumar in sod. 2004
Modelgenerator 0.82	Keane in sod. 2006
MrBayes 3.1.2	Huelsenbeck in Ronquist 2001
Muscle 3.6	Edgar in Robert 2004
NETWORK 4.2.0.1	Fluxus Technologies Ltd., ZDA
Paup* 4.0b10	Swofford 2002
PHYML 2.4.4	Guindon in Gascuel 2003
PRAP 1.21	Müller 2004
TCS 1.21	Clement in sod. 2000

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija genomske DNA

Z britvico smo odrezali košček tkiva z zadnjega dela živali in pri tem pazili, da nismo prerezali tudi prebavila živali, ker prebavila lahko vsebujejo tkiva živali drugih vrst, zato je možna kontaminacija pri izolaciji DNA pijavk s tujo DNA. Vsakokrat smo vzeli novo britvico in petrijevko, po potrebi tudi nove rokavice, pinceto pa smo sproti čistili s 96% etanolom in papirnato brisačo. Košček tkiva smo nasekljali na čim manjše delce v petrijevki s pomočjo britvice in pincete in ga prenesli v mikrocentrifugirko. Ta je ostala odprta toliko časa da je izhlapel ves alkohol, saj bi zaviral delovanje encimov v nadaljni izolaciji. Genomsko DNA smo izolirali s kompletom »GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep kit« (Sigma) po navodilu proizvajalca po sledečem protokolu:

Liza tkiva:

- koščke tkiva smo lizirali v 180 µl liznega pufra Lyse T: 10 minut na stresalniku pri 55-60°C
- lizatu smo dodali 20 µl proteinaze K (20 mg/ml) in 1-2 uri stresali na stresalniku pri 61°C (ob slabi razgradnji tkiva smo dodali še 5 µl proteinaze K in ustrezno podaljšali čas inkubacije pri 61°C)
- mešanici smo dodali 20 µl Rnaze A (50 enot/ml) in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi
- na koncu smo mešanici dodali še 200 µl liznega pufra Lysis solution C, ter inkubirali 10 minut pri 70°C

Kolone:

- membrane kolon smo aktivirali z nanosom 500 µl raztopine za pripravo membran (»Column Preparation Solution«), ter 5 minutno inkubacijo na sobni temperaturi
- aktivacijsko raztopino smo sprali s kolon z enominutnim centrifugiranjem pri 12600 obr/min

- v lizat smo dodali 200 µl 96% etanola iz zamrzovalnika in ga mešali 10-15 sekund
- mešanico lizata smo naložili v kolone
- kolone smo spirali s centrifugiranjem eno minuto pri 12600 obr/min; filtrat smo zavrgli
- zgornji del kolone z membrano smo prenesli v novo centrifugirko
- kolone smo spirali s 500 µl raztopine za spiranje («Wash Solution») s centrifugiranjem, 1 minuto pri 12600 obr/min; filtrat smo zavrgli
- zgornji del kolone z membrano smo prenesli v novo centrifugirko
- kolone smo ponovno spirali s centrifugiranjem s 500 µl raztopine za spiranje (da odstranimo ves etanol), 3 minute pri 12600 obr/min
- DNA smo eluirali z 100 µl elucijskega pufra («Elution Solution»), 5 minut pri sobni temperaturi, nato je sledilo centrifugiranje eno minuto pri 6300 obr/min

Koncentracijo in kvaliteto DNA smo preverjali z elektroforezo v 1% agaroznem gelu v pufru TAE. Na gel smo nanašali 3 µl nerazredčenega vzorca. Vzorce genomske DNA smo shranili v zamrzovalniku pri -20°C.

3.2.2 Pomnoževanje v verižni reakciji s polimerazo (PCR)

V verižni reakciji s polimerazo *Taq* smo pomnoževali približno 500 bp dolgo sekvenco mitohondrijskega gena za 12S rRNA in približno 660 bp dolgo sekvenco mitohondrijskega gena za citokrom oksidazo I (v nadaljevanju COI). V obeh primerih smo z namenom pridobivanja zadostne količine želenega produkta izvedli dve zaporedni PCR. V prvi reakciji (15 µl) smo z ustrezno kombinacijo začetnikov pomnoževali genomsko DNA. Dobljen produkt smo nato enako kombinacijo začetnikov pomnoževali v drugi (70µl) reakciji PCR.

Za pomnoževanje dela gena za 12S rRNA smo uporabili začetna oligonukleotida 12S lev in 12S des1:

12Slev	5'-GCCAGCAGCCGCGGTTA-3'
12Sdes1	3'- CCTACTTTGTTACGACTTAT- 5'

Protokol za prvo, 15 µl reakcijo PCR za pomnoževanje gena za 12S rRNA:

15 µl reakcija:

11,0 µl H₂O

1,5 µl 10 x PCR pufra z MgCl₂

1,5 µl 2 mM dNTP

0,2 µl + 0,2 µl oligonukleotidnega začetnika

0,07 µl 0,35 U polimeraze DNA

0,5 µl vzorčne DNA

Uporabili smo naslednji program:

94°C	180 s] 30 ciklov
94°C	45 s	
46°C	30 s	
72°C	60 s	
72°C	180 s	

Po končanem programu smo iz 15 µl reakcijske mešanice odvzeli 2,5 µl produkta in ga uporabili kot matrico v drugi, 70 µl reakciji PCR, ki smo jo izvedli po enakem programu kot prvo reakcijo.

70 µl reakcija:

54,0 µl H₂O

7,0 µl 10 x PCR pufra z MgCl₂

7,0 µl 2 mM dNTP

0,93 µl + 0,93 µl oligonukleotidnega začetnika

0,4 µl 0,35 U polimeraze DNA

2,5 µl vzorčne DNA

Za pomnoževanje dela mitohondrijskega gena za COI smo uporabili začetna oligonukleotida LCO in HCO:

LCO1490 5'-GGTCAACAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
HCO2198 5'-TAAACTTCTTCAGGGTGCCAAAAAATCA-3'

Razmerje reagentov v prvi, 15 µl reakciji PCR za pomnoževanje gena za COI je bilo enako kot v prvi, 15 µl reakciji PCR za pomnoževanje gena za 12S rRNA, izvedli pa smo jo po naslednjem programu:

94°C	180 s	}	30 ciklov
94°C	45 s		
48°C	45 s		
72°C	60 s		
72°C	120 s		

Ponekod je bil PCR produkt prve reakcije komaj opazen. Tam smo za začetek povečali količino vzorčne DNA. Če tudi to ni prineslo boljših rezultatov, smo pomnoževali del gena COI s pomočjo tako imenovanega »predhodnega pomnoževanja«. To smo izvedli v 15 µl reakciji z enakim razmerjem reagentov kot v prvi, 15 µl reakciji za pomnoževanje gena za COI, po naslednjem programu:

94°C	180 s	}	15 ciklov
94°C	45 s		
52°C	45 s		
72°C	90 s		
72°C	180 s		

Po končanem programu smo iz 15 μl reakcijske mešanice odvzeli 5 μl produkta in ga uporabili kot matrico v drugi, 70 μl reakciji PCR. Razmerje reagentov in program pomnoževanja sta bila enaka kot v drugi, 70 μl reakciji PCR za pomnoževanje gena za 12s rRNA.

Po vsakem pomnoževanju smo količino produkta in dolžino pomnoženega fragmenta preverjali s horizontalno elektroforezo v agaroznem gelu po naslednjem postopku:

- kaseto za gel smo zložili po priloženih navodilih,
- pripravili smo 1% agarozni gel in ga vlili v kaseto v debelini 3 do 5 mm,
- etidijev bromid (2,0 μl) smo dodali med strjevanjem,
- na gel smo naložili od 1 do 3 μl vsakega PCR produkta, katerega smo predhodno pomešali z aplikacijskim pufrom,
- elektroforezo smo prvih 10 minut izvajali pri napetosti 22 V, nato pa pri 60 V, dokler ni fronta barvila prišla približno do polovice gela.

3.2.3 Čiščenje produktov PCR

3.2.3.1 Čiščenje produktov PCR s pomočjo membranskega sistema (Millipore Montagne, Bedford, ZDA)

- pred nanosom celotnega volumna posamezne reakcije PCR smo vsako vdolbinico na plošči membranskega sistema aktivirali s 50 μl destilirane vode,
- vzorce smo filtrirali preko membrane s pomočjo vakuumske črpalke ob podtlaku 15 - 20 bar, pri čemer so se produkti PCR reakcij vezali na membrano,
- ponovno smo v vdolbinice nanесли po 50 μl destilirane vode in dali ploščo na stresalnik za 10 minut na 100 vrt/min, nato smo ponovno filtrirali vzorce preko membrane s pomočjo vakuumske črpalke (postopek smo ponovili dvakrat),
- nato smo vzorcem dodali po 20 - 30 μl destilirane vode, pustili stati 10 minut, nato pa odpipetirali vzorce v mikrocentrifugirke,
- uspešnost čiščenja vzorcev smo preverili na 1% agaroznem gelu.

3.2.3.2 Čiščenje produktov PCR z elucijo

Kjer smo kljub čiščenju s pomočjo membranskega sistema dobili nespecifične PCR produktov (dimere), smo uporabil izolacijo ustreznega produkta iz agaroznega gela. To smo izvedli po sledečem protokolu:

- pripravili smo debelejši 1,5% agarozni gel, ki smo mu med vlivanjem dodali etidijev bromid (2,5 µg/ 10 ml gela),
- celotni PCR produkt (70 µl) z dodanim aplikacijski pufrom (2 µl) smo naložili na gel,
- elektroforeza je potekala pri napetosti 55 V približno eno uro, na razdalji med elektrodama 17 cm,
- na transluminatorju smo z rezilom označili sprednji rob pomnoženega produkta glede na smer potovanja,
- nato smo izrezali luknjice v gelu pred označenim sprednjim robom v velikosti lise pomnoženega produkta in ga zavrgli,
- luknjice smo sprali s čistim 1 x TAE ter s papirnato brisačo obrisali zgornjo stran gela,
- očiščene in osušene luknjice smo do roba napolnili s čistim pufrom 1 x TAE,
- sledila je elucija pri 220 V, 34 sekund za 12S in 25 sekund za COI, s katero smo PCR produkt spravili v TAE pufer v luknjico,
- ves pufer z vzorcem smo prenesli v 1,5 µl mikrocentrifugirko,
- luknjice smo ponovno napolnili s čistim 1 X TAE pufrom in ponovno eluirali preostanek produkta krajši čas pri 200 V,
- na transluminatorju smo preverili uspešnost elucije in po potrebi elucijo ponovili
- odpipetiranemu pufri z vzorcem smo dodali 10% volumna 4M LiCl, novonastalemu volumnu pa 2,5-kratni volumen ledeno hladnega 96% etanola,
- dodali smo 0,3 µL barvila za obarvanje DNA v usedlini («pellet paint»),
- po rahlem mešanju je sledilo obarvanje nukleinskih kislin 45 minut v zamrzovalniku pri -70°C,
- vzorec smo centrifugirali 20 minut pri 4°C in 21000 obr/s in previdno odlili etanol,
- sledilo je čiščenje vzorca z 400 µl ledeno hladnega 70% etanola,

- ponovno smo centrifugirali, 5 minut pri 4°C in pri 21000 obr/s,
- vzorec smo posušili pri 40°C,
- DNA smo resuspendirali v 25 µl vode in pustili 30 minut na sobni temperaturi.

Koncentracijo in kvaliteto DNA smo preverjali na 1% agaroznem gelu v pufru TAE. Na gel smo nanašali 3 µl nerazredčenega vzorca. Eluate smo shranili v zamrzovalniku pri - 20°C.

3.2.3 Sekvenčna analiza

Sekvenčno analizo produktov PCR genov za 12S rRNA in COI so izvedli po našem naročilu v podjetju Macrogen (www.macrogen.com/eng/macrogen) (Južna Koreja). Analiza je bila izvedena s Sagnerjevo metodo sekvenciranja na sekvenatorju 3730xl DNA analyzer« (Applied Biosystems, ZDA) z enakima začetnikoma, kot smo jih uporabili pri pomnoževanju.

Tako pridobljene sekvence genov za 12S rRNA in COI smo popravili s programom ChromasPro (verzija 1.33) in nekatere s programom AlWin. Sekvence genov za 12S in COI smo poravnali s programom Muscle 3.6 (Edgar 2004) in odstranili zaporedja začetnikov.

Kodirajoča zaporedja COI smo s programom ChromasPro tudi sestavili in preverili ujemanje prebranih zaporedij. Nato smo jih s programom Mega 3.1 (Kumar in sod. 2004) pregledali in prevedli v aminokislinska zaporedja po kodu za nevretenčarsko mitohondrijsko DNA ter preverili prisotnost morebitnih stop kodonov. Napake v poravnanih zaporedjih, ki so bile večinoma vezane le na posamičen osebek, smo popravili ročno v programu BioEdit 5.0.9 (Hall 1999).

3.2.4 Filogenetska analiza

Sekvence genov za 12S in COI smo poravnali s programom Muscle 3.6 (Edgar 2004). V programu Mega 3.1 (Kumar in sod. 2004) smo poravnane sekvence pregledali in preverili prisotnost morebitnih stop kodonov. Nekatere segmente poravnave smo popravili ročno v programu BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999). Sekvence smo nato shranili v različnih formatih glede na zahteve uporabljenih računalniških programov. Filogenetsko analizo smo izvedli na ločenih zaporedij obeh genov, kot tudi na podlagi združenih zaporedij obeh genov, ki smo jih sestavili tako, da smo zaporedju gena za COI pripeli zaporedje gena za 12S rRNA.

Filogenetske odnose smo ugotavljali z metodo varčnosti ("maximum parsimony") (Fitch 1971), metodo največjega verjetja ("maximum likelihood") in Bayesovi metodi («Bayesian inference«).

Metodo varčnosti smo izvajali s program Paup* 4.0b10 (Swofford 2002). Vsem tipom nukleotidnih substitucij smo dodelili enako težo. Drevesa smo iskali hevristično z naključnim dodajanjem taksonov (zaporedij) in premeščanjem vej po metodi razreza in ponovnega združevanja («tree bisection and reconstruction«). S tem načinom iskanja pregledamo le podmnožico možnih dreves in z veliko verjetnostjo najdemo najkrajše možno drevo (Swofford in Sullivan, 2003). Hevrističen način iskanja je potekal v dveh korakih:

- izgradnja izhodiščnega drevesa z naključnim postopnim dodajanjem haplotipov ("random addition"),
- premeščanje vej ("branch swapping") po metodi razreza in ponovnega združevanja ("tree bisection and reconnection, TBR).

Obe fazi postopka smo izvedli s 500 ponovitvami. Po naključnem dodajanju se v vsaki ponovitvi sekvence dodajajo k predhodnim v drugačnem, naključnem vrstnem redu. Na koncu tega postopka dobimo več dreves z enako, najmanjšo dolžino vej, ki pa so večinoma daljša od dejanskega drevesa največje varčnosti. Topologijo smo združili v drevo 50 odstotnega večinskega soglasja. Tako so na

tem drevesu prikazane dihrotomne cepitve, ki se pojavljajo pri več kot 50 odstotkih najvarčnejših dreves, ostale so združene v politomije.

Za iskanje drevesa največjega verjetja smo najprej ugotovili model substitucije s programom Modelgenerator 0.82 (Keane in sod. 2006). Izbrani model smo uporabili za izdelavo filogenetskih dreves po metodi največjega verjetja s programom PHYML 2.4.4 (Guindon in Gascuel 2003). Statistične podpore posameznih cepitev smo izračunali z neparametričnim testom samovzorčenja («bootstrap») s po 500 ponovitvami.

Bayesovo filogenetsko drevo smo poiskali s programom MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck in Ronquist, 2001). Tudi v tem primeru smo uporabili predhodno predlagani model evolucije. Posteriorne verjetnosti cepitev smo iskali z algoritmom MCMC («Markov Chain Monte Carlo»). Hkrati smo vzorčili drevesa iz vsake od štirih markovskih verig s po 2×10^6 stanji. Vzorčili smo vsako stoto stanje, s čimer smo se izognili avtokorelaciji zaporednih vzorcev. V izračunih posteriornih vrednosti prvih 500.000 stanj nismo upoštevali, saj v tem času veriga še ni dosegla stacionarnosti in so se ocene posteriornih verjetnosti še bistveno spreminjale. Tudi pri tej metodi so osnova specifični evolucijski modeli. Metoda kot najbolj verjetno drevo opredeli drevo na podlagi modela substitucije in podatkov, ki so bili uporabljeni.

3.2.5 Filogeografija

3.2.5.1 Mrežna analiza haplotipov («Network analysis»)

Mrežno analizo haplotipov preiskovanih pijavk smo izvedli na podlagi sekvenc genov za 12S rRNA in COI. Frekvenco posamezne sekvence smo ugotavljali s programom DAMBE 4.5.2 (Xia in Xie 2001), v katerega smo vnesli poravnane sekvence obeh genov. Matriko poravnanih sekvenc z dodeljenimi frekvencami smo vnesli v program NETWORK 4.2.0.1 (Fluxus Technologies Ltd., ZDA) ter s postopkom «median joining» izračunali mrežo haplotipov.

Pri prikazovanju rezultatov mrežne analize kladov (median network) smo se skušali opirati na načela koalesenčne teorije (Freeland, 2005, Templeton 1998), ki predvideva:

1. Da so haplotipi z najvišjo frekvenco praviloma najstarejši.
2. V mreži haplotipov so notranji haplotipi starejši, mlajši haplotipi se razporejajo ob robu mreže.
3. Haplotipi z več povezavami so praviloma starejši.
4. Starejši haplotipi so geografsko bolj razširjeni, saj so imeli za razširjanje na voljo več časa.
5. Haplotipi iste populacije so praviloma povezani z eno samo povezavo, saj so se razvili najkasneje in tako niso imeli dovolj časa za razširjanje.

3.2.5.2 Hierarhična analiza kladov

Demografske procese odgovorne za povezave med filogenijo in geografijo preiskovanih haplotipov pijavk smo poskušali razložiti z metodo hierarhične analize kladov. Najprej smo po metodi »statistical parsimony« izdelali mrežo haplotipov, ki so med seboj povezani glede na podobnost sekvenc (Templeton 1987; Templeton in sod. 1995; Crandall 1996), za kar smo uporabili program TCS 1.21 (Clement in sod. 2000). Z njim v prvem koraku izračunamo mejo varčnosti: to je največje dopustno število razlik v sekvencah med dvema oseboma, ki še zadosti kriteriju varčnosti z verjetnostjo 90 do 95% (Templeton in sod. 1992). V primeru, da je to število preseženo, so mreže haplotipov ločene. Vsaka povezava v mreži pomeni posamezno razliko v zaporedju nukleotidov, zato so haplotipi, ki se med seboj razlikujejo za večje število mutacij, pogosto ločeni z vmesnimi haplotipi, ki niso bili vzorčeni. Taki haplotipi so prikazani z ničlo, v nadaljnjem postopku izdelave drevesa pa jih ohranimo, ker so pomembni pri zduževanju v hierarhijo kladov (Crandall 1996). Ker je v mreži lahko z enim mutacijskim korakom med seboj povezanih več haplotipov, je treba ugotoviti najverjetnejšo povezavo med njimi. To smo ugotovili na podlagi kriterijev, oblikovanih po koalescenčni teoriji

(Crandall in Templeton 1993, prevedeno v Verovnik 2003), s čimer smo dobili mreže haplotipov brez nejasnih povezav.

Tako dobljene enoznačne mreže smo pretvorili v hierarhično strukturo kladov po postopku, opisanem v Crandall in Templeton (1993) ter Templeton in Sing (1993). Na kratko je postopek sledeč: začnemo pri zunanjih haplotipih, (haplotipi so ničte stopnje), in povežemo tiste, ki se med seboj razlikujejo za eno spremembo v zaporedju nukleotidov, v klade prve stopnje. Od zunanjih haplotipov gremo nato postopoma proti notranjim, dokler niso vsi haplotipi v skupinah prve stopnje. Pri tem se lahko zgodi, da kateri izmed notranjih haplotipov ostane zunaj. V tem primeru ta haplotip priključimo kladu, ki vključuje manjše število osebkov, s čimer mu povečamo statistično težo (Templeton in Sing 1993). Klade prve stopnje po enakem principu združimo v klade druge stopnje. Postopek ponavljamo, dokler niso vsi kladi v hierarhični strukturi združeni v enega.

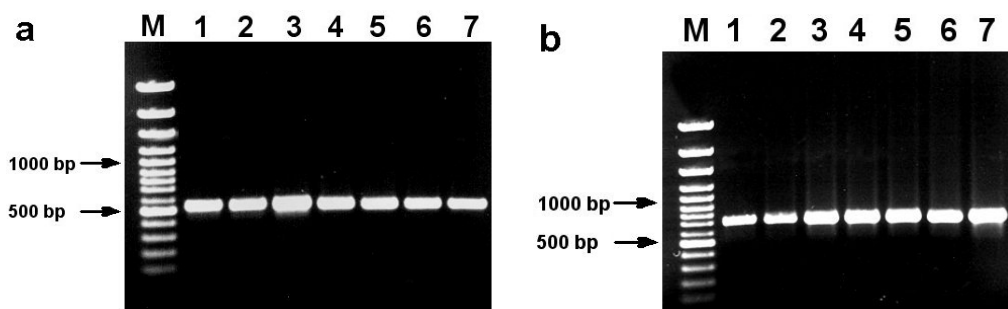
Geografske razdalje med populacijami smo določili na podlagi koordinat. Vse geografske vrednosti smo izračunali s programom GEODIS 2.5 (Posada in sod. 2000). Ta geografski center klada določi kot povprečje vrednosti koordinat vseh enot. Po biološki interpretaciji je D_c mera geografske razširjenosti haplotipov znotraj določenega klada, D_n pa nam pove, kako daleč so haplotipi znotraj tega klada od evolucijsko najbližjih haplotipov v sestrskih kladah (Templeton in sod. 1995). Statistično značilnost geografske razporeditve povprečnih razdalj smo preverili z neparametričnim permutacijskim testom s 1000 permutacijami osnovne matrike razdalj proti parametričnim kladom. Polarizacijo dreves smo določali na podlagi lege haplotipov z veliko frekvenco, ki so po koalescenčni teoriji starejši od redkih haplotipov. Statistično značilnost geografske povezave znotraj vsakega klada smo ugotavljali s kontingenčnim χ^2 testom. Statistično analizo geografskih povezav med kladi smo prikazali grafično. Klade s statistično značilnimi geografskimi parametri smo ovrednotili s ključem (Templeton 1998, Verovnik 2004), s katerim smo interpretirali demografske dogodke.

4. REZULTATI

4.1 IZOLACIJA DNA IN POMNOŽEVANJE GENOV ZA 12S rRNA IN COI

Uspešnost izolacije genomske DNA 115 pijavk iz 32 lokalitet smo preverjali z gelsko elektroforezo. Zadostna količina in kakovost izolirane DNA je bila vidna kot izrazita lisa. V primeru nezadostne količine ali poškodovane (fragmentirane) genomske DNA smo izolacijo ponovili.

Uspešno izolirano genomsko DNA smo uporabili kot matrico v 15 μ l in 70 μ l reakcijah PCR, s katerimi smo pomnoževali približno 500 bp dolg del gena za 12S rRNA (Slika 6) in približno 660 bp dolg del gena za COI (Slika 6).

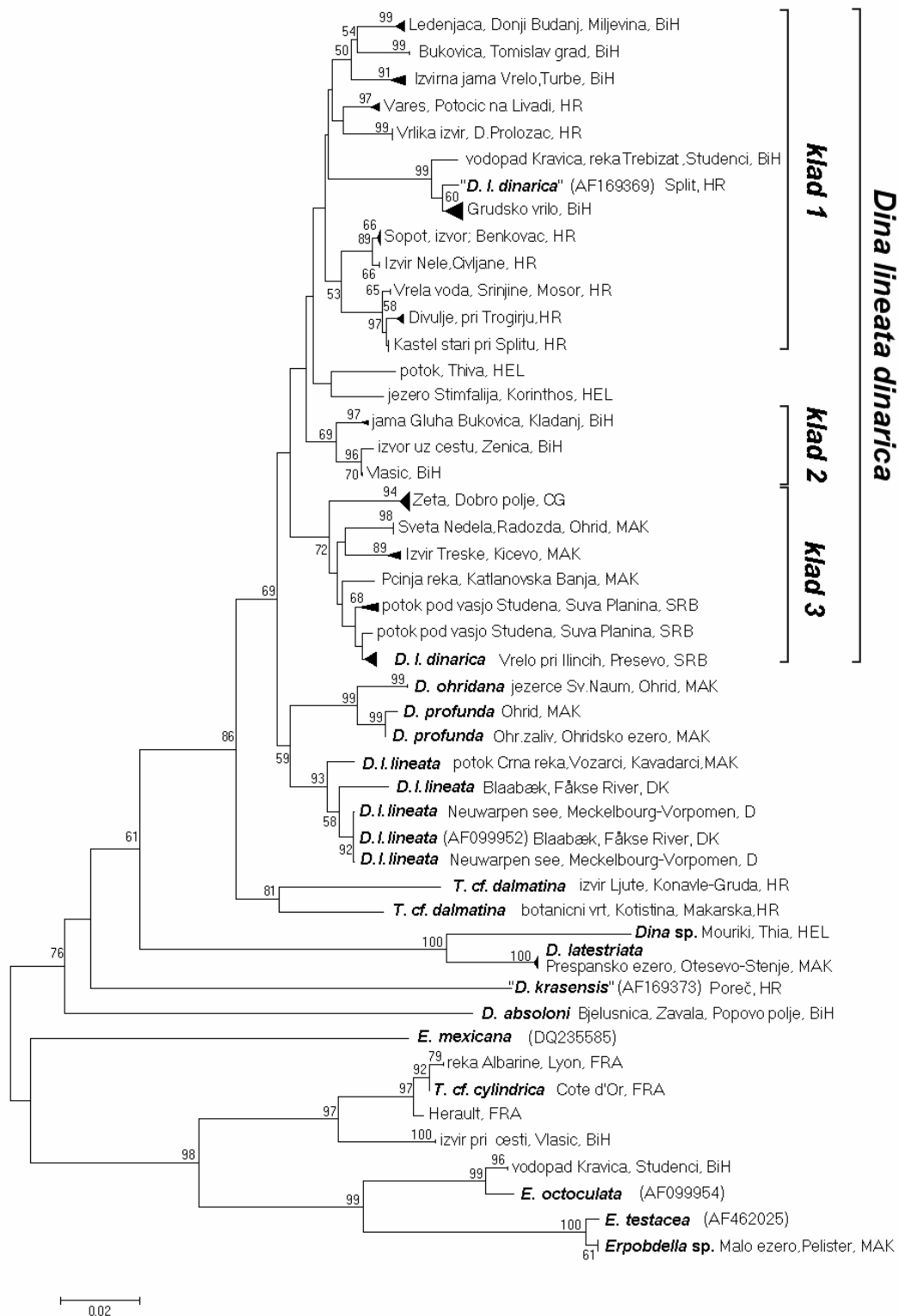


Slika 6: Lise pomnoženih delov genov za 12S rRNA (a) in COI (b) sedmih pijavk (1-7: produkti reakcij PCR, M: velikostni standard »Gene Ruler™ 100 bp DNA« MBI Fermentas, Vilna, Litva)

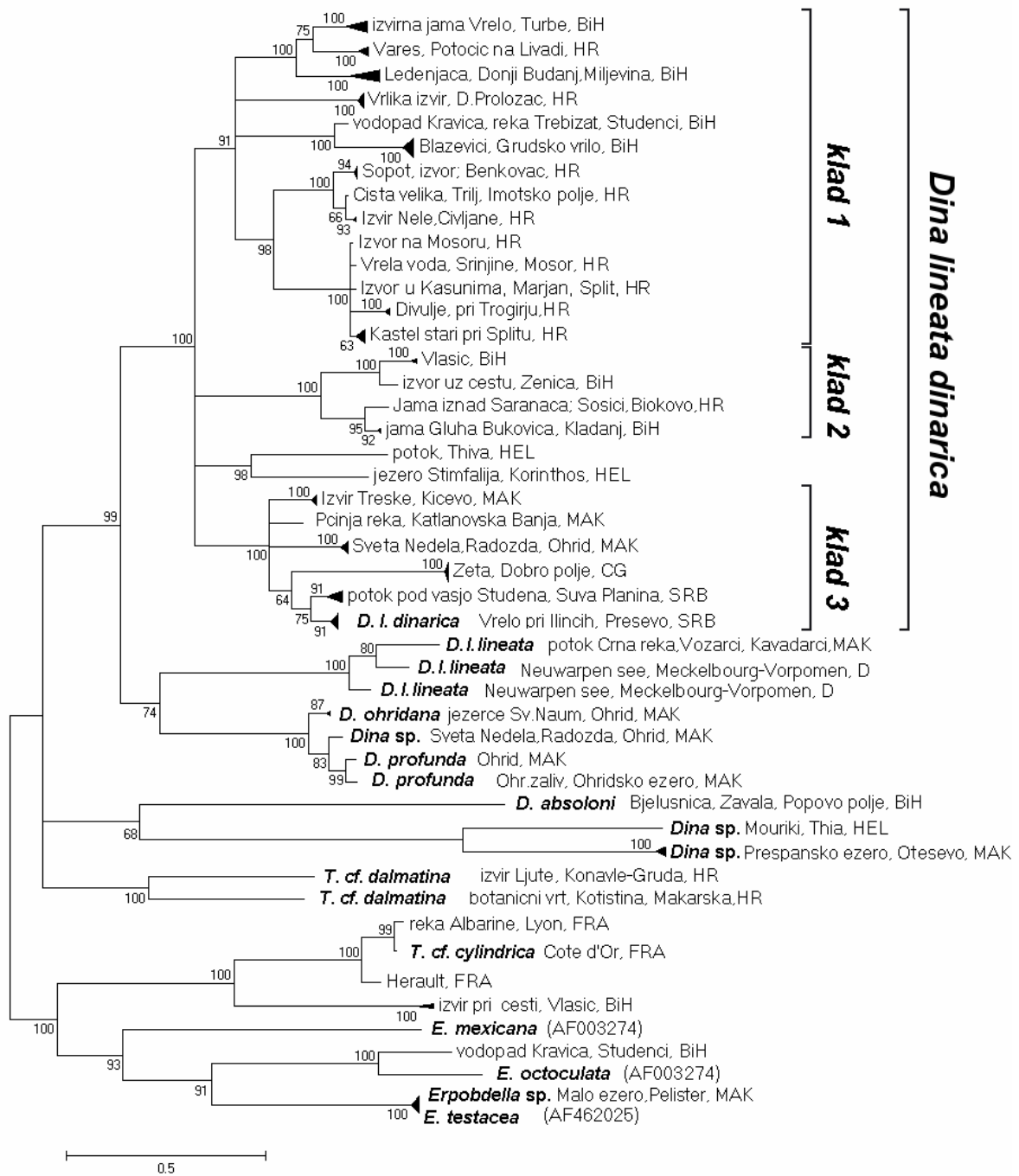
4.2 SEKVENČNA ANALIZA, OBDELAVA SEKVENC IN FILOGENETSKA ANALIZA

Filogenetsko analizo smo izvedli ločeno na zaporedjih genov za 12S rRNA (Slika 7) in COI (Slika 8), kot tudi na podlagi združenih zaporedjih obeh genov (Slika 9). Sestavili smo jih tako, da smo zaporedju gena za COI pripeli zaporedje gena za 12S rRNA. Filogenetske odnose med haplotipi preiskovanih pijavk smo ugotavljali s tremi metodami: metodi varčnosti (PA), metodi največjega verjetja (ML) in z Bayesovo statistiko (BA).

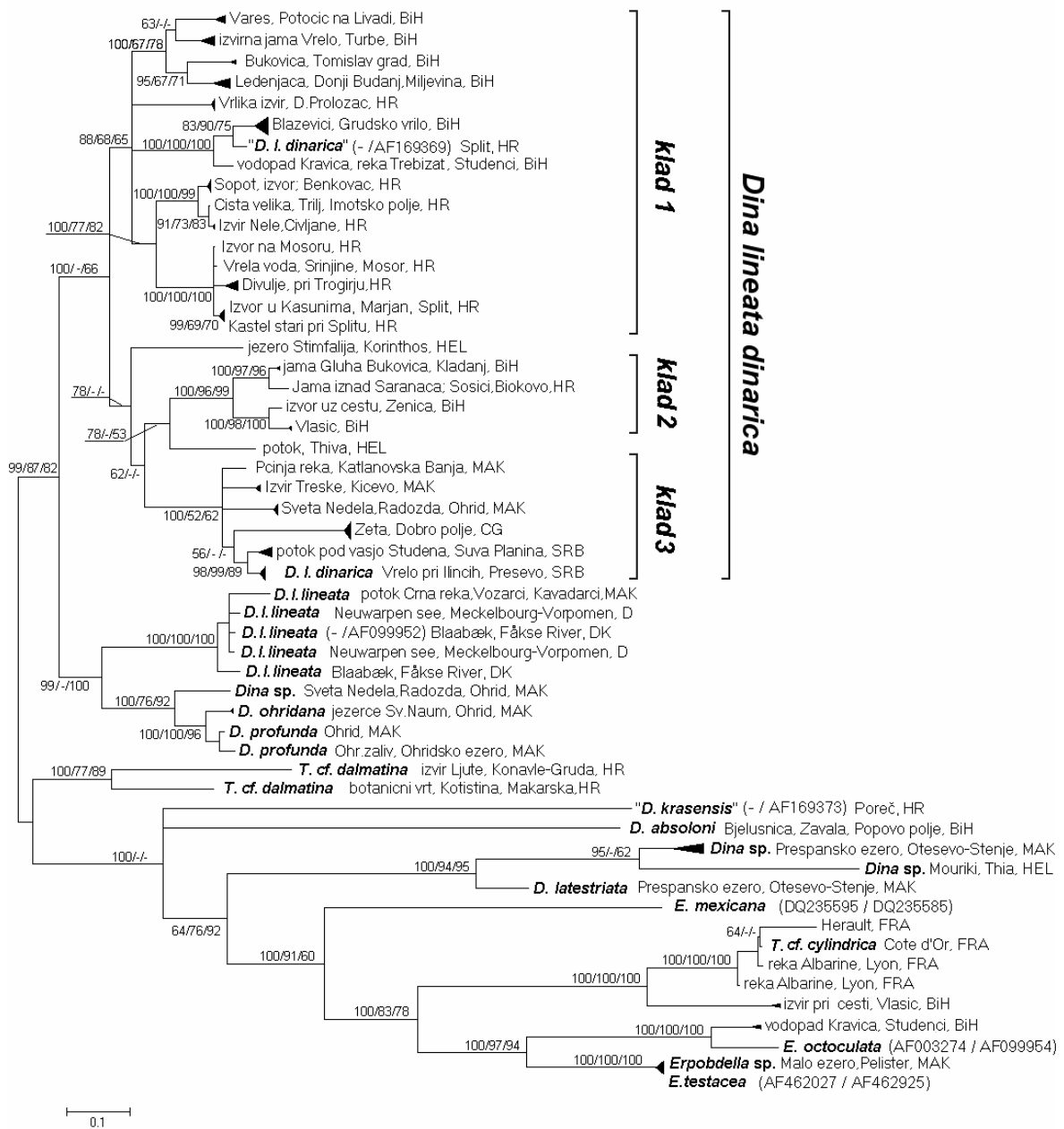
Pri genu za 12S rRNA smo za koreninjenje drevesa uporabili zunanjske pijavke vrste *Trocheta cf. cylindrica*, *T. cf. dalmatina*, *Dina latestriata*, *D. absoloni*, *D. profunda* in *D. ohridana*. Dodali smo še zaporedja pijavk *Erpobdella mexicana* (DQ2335585) (Oceguera-Figueroa in sod., neobjavljeno), *E. testacea* (AF462025) (Sidall 2001) in *E. octoculata* (AF099954) (Trontelj, 1998). *D. lineata dinarica* (AF169369) (Trontelj in Sket 2000), *D. krasensis* (AF169373) (Trontelj in Sket 2000) in *D. lineata* (AF099952) (Trontelj 1999), vse iz baze GenBank. Vsa drevesa izdelana z zgoraj navedenimi filogenetskimi metodami imajo podobno bazalno topologijo in podporo razvejitev, zato je prikazano filogenetsko drevo haplotipov pijavk na podlagi gena za 12S rRNA le za Bayesovo statistiko (slika 7). Pri vseh drevesih veljajo za dobro podprte cepitve kladov s podporo nad 95%.



Slika 7: Drevo haplotipov pijavk na podlagi gena za 12S rRNA izdelanega po Bayesovi metodi. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po GTR+I+ Γ modelu substitucij. Številke prikazujejo relativno podporo razvejitve izraženo v odstotkih. Merilo prikazuje razmerje števila substitucij z dolžino vej.



Slika 8: Drevo haplotipov pijavk na podlagi gena COI izdelanega po Bayesovi metodi. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po GTR+I+ Γ modelu substitucij. Številke prikazujejo relativno podporo razvejitev izraženo v odstotkih. Prikazane so le podpore višje od 50%. Merilo prikazuje razmerje števila substitucij z dolžino vej.



Slika 9: Drevo haplotipov pijavk sestavljenih zaporedij (gen za COI in 12S rRNA) po Bayesovi statistiki (BA). Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami po GTR+I+Γ modelu substitucij. Številke prikazujejo relativno podporo razvejitev izračunano po metodi varčnosti (PA)/metodi največjega verjetja (ML)/Bayesovi statistiki izraženo v odstotkih. Prikazane so le podpore višje od 50%. Merilo prikazuje razmerje števila substitucij z dolžino vej.

Pri genu COI smo za koreninjenje drevesa uporabili zunanjske pijavke vrste *Trocheta cf. cylindrica*, *T. cf. dalmatina*, *Dina absoloni*, *D. profunda* in *D. ohridana*. Iz baze GenBank so bila dodana zaporedja pijavk *Erpobdella mexicana* (DQ2335595) (Oceguera-Figueroa in sod. 2005), *E. testacea* (AF462027) (Apakupakul in sod. 1998) in *E. octocolata* (AF003274) (Sidall in Burreson 1997). Slika 8 prikazuje filogenetsko drevo haplotipov pijavk na podlagi sekvenc gena za COI izdelano z Bayesovo statistiko. Drevo največjega soglasja in drevo izdelano po metodi varčnosti imata podobno topologijo in podporo razvejitev, kot prikazano Bayesovo drevo.

Ker se topologiji dreves genov za 12S rRNA in COI bistveno ne razlikujeta, smo izvedli filogenetsko analizo tudi na podlagi združenih zaporedij obeh genov (Slika 9). Za koreninjenje drevesa smo uporabili združene sekvence zunanjikov uporabljenih v filogenetskih analizah ločenih genov za 12S rRNA in COI. Kjer sekvenci obeh genov za posamezni vzorec nismo imeli na voljo, smo uporabili le sekvenco enega gena. Slika 9 prikazuje drevo izdelano po Bayesovi statistiki, v katerega smo ob razvejišča vnesli odstotke podpore izračunane po metodi varčnosti, metodi največjega soglasja in Bayesovi statistiki.

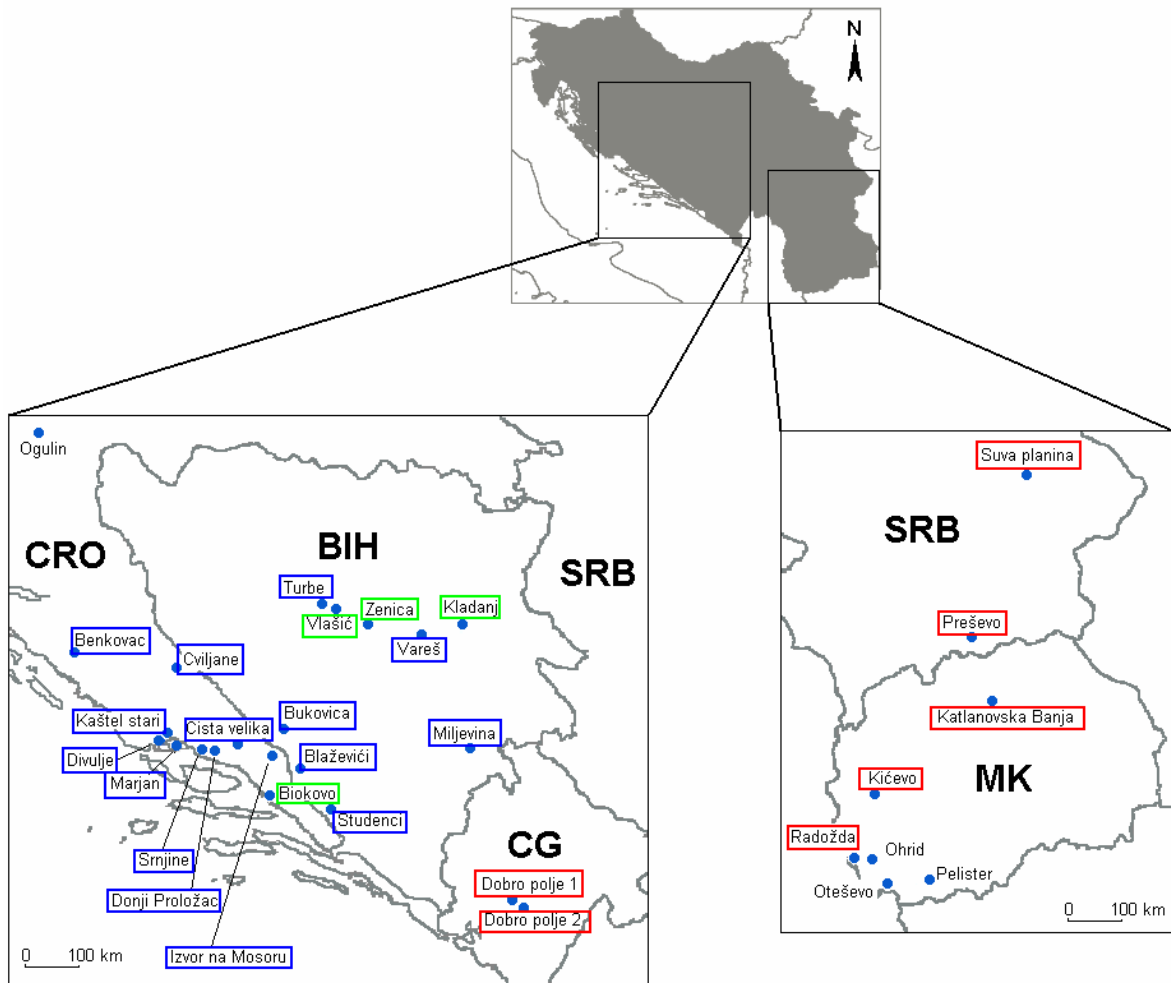
V vseh drevesih (slike 7-9) je razvidna monofilija klada, ki združuje haplotipe *D. lineata dinarica* iz Dinaridov ter haplotipa iz okolice Thive v osrednji Grčiji in jezera Stimfalija na Peloponezu (v nadaljevanju klad *D. l. dinarica*). Topologija razvejitev znotraj omenjenega klada se med drevesi razlikuje in ima večinoma nizko podporo. Kljub temu je opazna in dobro podprta monofilija haplotipov iz Hrvaške ter Turb, Bukovice, Miljevine, Studencev in Blaževićev v Bosni in Hercegovini (v nadaljevanju »klad 1«) (slika 10) z visoko podporo v filogenijah gena za COI in združenih sekvenc. Klad 1 združuje več dobro podprtih skupin haplotipov, ki pa niso izključno geografsko določene. Tako so združeni dalmatinski haplotipi iz Benkovca, Ciste velike, Civljan, Izvora na Mosoru, Srinjinj, Divulj, Marjana in Kaštela starog pri Splitu, ne pa tudi haplotipi iz Donjeg Proložca v neposredni bližini ter haplotipa iz Biokova, prav tako iz Dalmacije. Znotraj klada 1 je dobro podprta tudi skupina, ki združuje haplotipe iz Grudskega vrila in Trebižata v Bosni

in Hercegovini ter haplotip populacije *D. lineata dinarica* iz Splita (Trontelj in Sket 2000). Tretjo skupino v kladu 1 tvorijo haplotipi iz Vareša, Turb, Tomislavgrada in Miljevine v Bosni in Hercegovini, medtem ko haplotipi iz Donjega Proložca na Hrvaškem tvorijo samostojno skupino znotraj klada 1.

Prav tako je v vseh drevesih opazna monofilija skupine haplotipov iz Srbije, Črne gore ter Kičeva, Radožde in Katlanovske Banje v Makedoniji (v nadaljevanju »klad 3 (slika 10)). Znotraj klada 3 so z visoko podporo združeni kladi iz Srbije. Položaj haplotipov iz Črne gore in Makedonije v kladu 3 pa je nejasen, saj se med drevesi sekvenc za 12S rRNA in COI razlikuje.

Poleg obeh omenjenih kladov znotraj *D. l. dinarica* je opazna tudi monofilija haplotipov iz Vlašića, Zenice in Kladnja v Bosni in Hercegovini ter haplotipa iz Biokova na Hrvaškem (v nadaljevanju »klad 2«) (slika 10). Znotraj klada 2 je dobro podprta ločitev haplotipov iz Vlašića, Zenice in Kladnja v Bosni in Hercegovini od haplotipa iz Biokova na Hrvaškem. Podpora klada 2 in skupin haplotipov v njem je dobra, saj na podlagi združenih sekvenc (slika 9) in sekvence COI (slika 8) dosegajo celo 100%.

Kladu *D. l. dinarica* najbližja skupina zunanjikov združuje haplotipe *D.l. lineata* iz Danske, Nemčije in Makedonije, ter klad haplotipov *D. profunda* in *D. ohridana* iz Ohridskega jezera. Med zunanjiki preseneča položaj klada, ki združuje sekvenci *T. cf. dalmatina*. Ta je oddaljen od haplotipov *T. cf. cylindrica* in je filogenetsko bližje kladu *D. lineata* kot sekvence *D. latestriata*, *D. krasensis* in *D. absoloni*. V nasprotju s pričakovanji so se med zunanjike razvrstili tudi nekateri haplotipi pijavk, ki naj bi glede na morfologijo pripadali podvrsti *Dina lineata dinarica*. Tako so se nekateri haplotipi iz Vlašića v Bosni razvrstili skupaj s skupino haplotipov rodu *Trocheta* iz Francije. Haplotipi iz Studencev, prav tako v Bosni, pa so se izkazali za najbolj sorodne vrsti *Erpobdella octoculata*.



Slika 10: Vzočna mesta pijavk, glede na razporejanje njihovih haplotipov v klade na podlagi filogenetske analize. (modro obrobljena imena lokalitet so združena v »kladu 1«, zeleno obrobljena imena lokalitet so združena v »kladu 2« in rdeče obrobljena imena lokalitet so združena v »kladu 3«)

4.3 FILOGEOGRAFSKA ANALIZA

4.3.1 MREŽNA ANALIZA HAPLOTIPOV

Z združevanjem identičnih zaporedij v matriki poravnanih sekvenc gena za 12S rRNA, ki smo jo izvedli s programom DAMBE, smo dobili 53 različnih haplotipov pijavk *D. lineata*, dolgih 483 bp. Okrajšave imen haplotipov in njihove frekvence so podane v tabeli 1. Pri združevanju se je 19 sekvenc pojavljalo več kot pri enem osebk. Najvišjo frekvenco pojavljanja sta imela haplotipa RAD1 in PRO1, vsak po

šest. V poravnanih sekvencah omenjenega gena je bilo 105 variabilnih mest, 378 evolucijsko ohranjenih mest in 78 informativnih mest po kriteriju varčnosti.

Tabela 1: Imena haplotipov pijavk. Kjer je prisoten več kot en osebek v haplotipu, je število osebkov podano v oklepaju. Poleg oznake osebkov z imenovanim haplotipom so podane tudi njihove lokalitete.

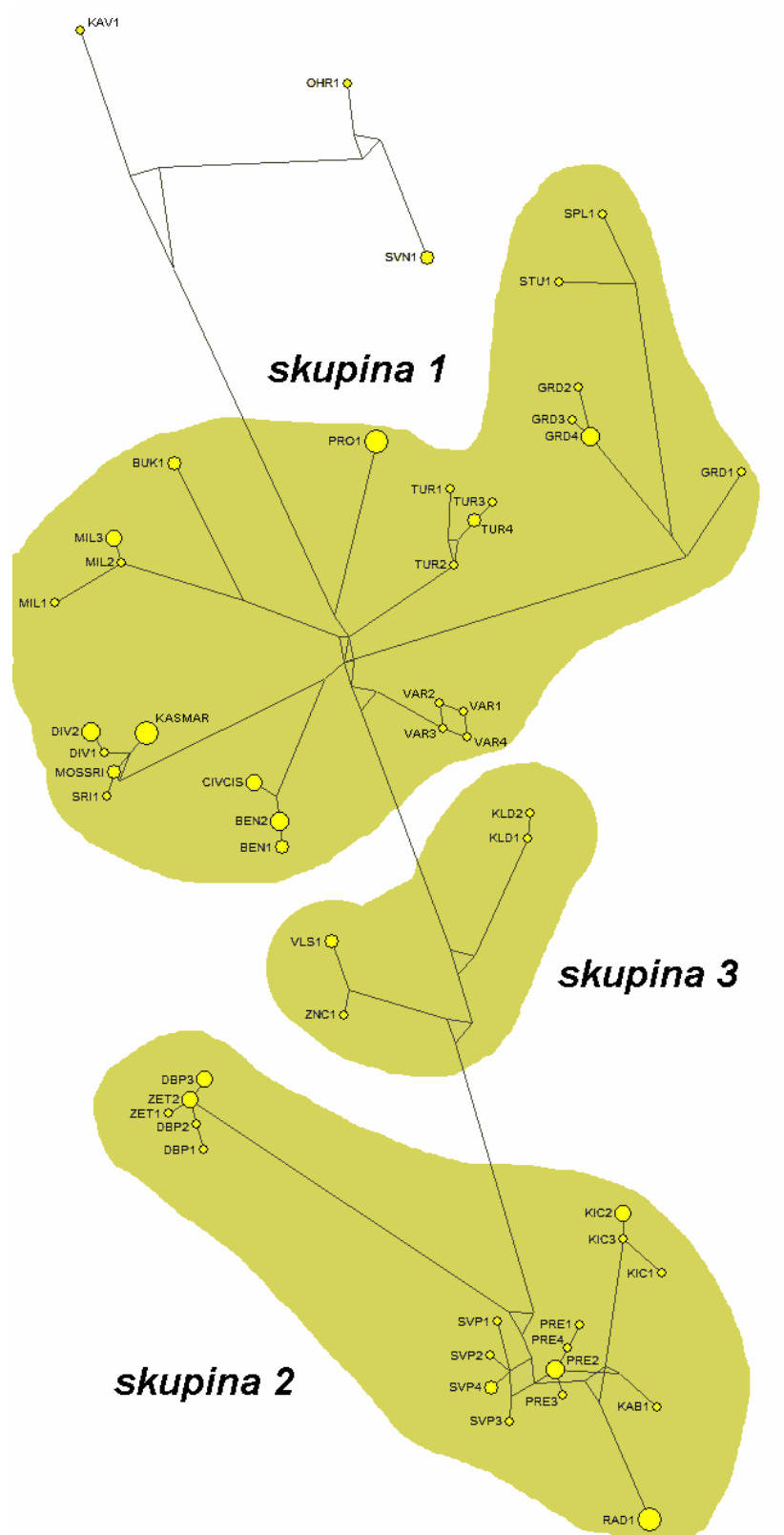
Okrajšava Lokalitete	12SrRNA haplotipi	COI haplotipi	Lokalitete
BEN	BEN1(2), BEN2(4)	BEN1(5)	Benkovac, HR
BIO	-	BIO1	Biokovo, HR
BUK	BUK1(2)	-	Bukovica, BiH
CIV	-	CIV1	Civljane, HR
CIVCIS	CIV1, CIV2, CIS1	-	Civljane, Cista velika, HR
DBP	DBP1, DBP2, DBP3(3)	-	Dobro polje, ČG
DIV	DIV1, DIV2(4)	DIV1, DIV2(2)	Divulje, HR
GRD	GRD1, GRD2, GRD3, GRD4(2)	GRD1-3, GRD4(3), GRD5-7	Grudsko vrilo, Gruda, BiH
KAB	KAB1	KAB1	Katlanovska Banja, MAK
KAS	-	KAS1, KAS2, KAS3, KAS4	Kaštel stari, HR
KASMAR	KAS1-6 (6), U1	KAS1-6, U1	Kaštel stari, Marjan-Split, HR
KIC	KIC1, KIC2(2), KIC3	KIC1(2), KIC2, KIC3	Kičevo, MAK
KAV	KAV1	-	Kavadarci, MAK
KLD	KLD1, KLD2	KLD1(2)	Kladanj, BiH
MIL	MIL1, MIL2, MIL3(3)	MIL1-5	Miljevina, BiH
OHR	OHR1	OHR1	Ohrid, MAK
PRE	PRE1, PRE2(4), PRE3, PRE4	PRE1(3), PRE2(3), PRE3	Preševo, SRB
PRO	PRO1(6)	PRO1, PRO2, PRO3, PRO4(3)	Donji Proložac, HR
RAD	RAD1(6)	RAD1(3), RAD2, RAD3, RAD4	Radodža, MAK
SPL	SPL1	SPL1	Split, HR
SRI	SRI1	SRI1	Srinjine, HR
SRIMOS	SRI2(2), MOS	SRI2, MOS	Srinjine, Mosor, HR
STU	STU1	STU1	Studenci, BiH
SVN	SVN1, SVN2	SVN1(2)	Sveti Naum, Ohrid, MAK
SVP	SVP1 SVP2, SVP3, SVP4	SVP1, SVP2, SVP3, SVP4(2)	Suva planina, SRB
TUR	TUR1, TUR2, TUR3, TUR4	TUR1, TUR2, TUR3, TUR4	Turbe, BiH
VAR	VAR1, VAR2, VAR3, VAR4	VAR1, VAR2, VAR3, VAR4	Vareš, BiH
VLS	VLS1(2)	VLS1, VLS2	Vlašić, BiH
ZET	ZET1, ZET2(3)	ZET1	Zeta, ČG
ZETDBP	-	ZET1(2), DBP1(5)	Zeta, Dobro Polje, ČG

Pri združevanju identičnih zaporedij v matriki poravnanih sekvenc gena COI smo dobili 64 različni haplotipov *D. lineata*, dolgih 657 bp. Okrajšave imen haplotipov in njihove frekvence so podane v tabeli 1. Pri združevanju se je 19 sekvenc pojavljalo več kot pri enem osebk. Najvišjo frekvenco pojavljanja sta imela haplotipa BEN1 (pet) in združen haplotip ZETDBP (sedem). V matriki poravnanih sekvenc je bilo 210 variabilnih mest, 447 evolucijsko ohranjenih mest in 179 informativnih po kriteriju varčnosti.

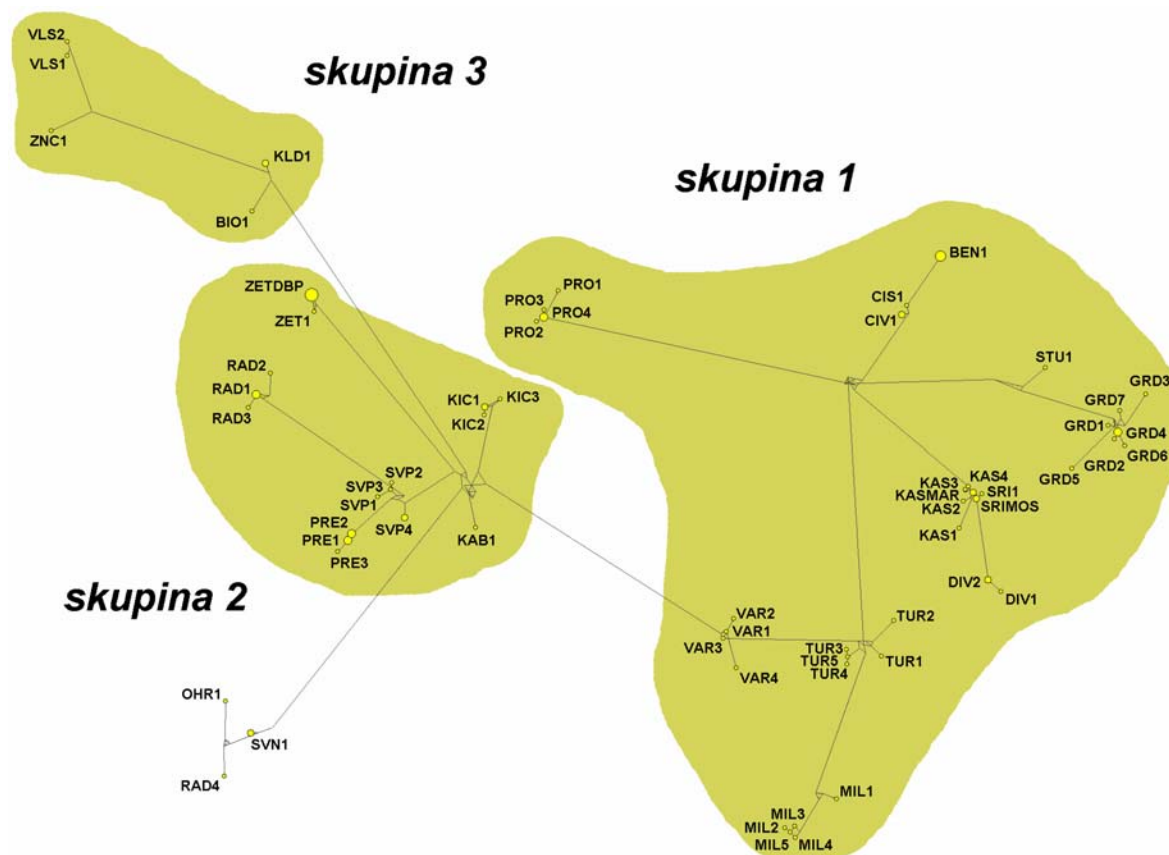
Mrežno analizo haplotipov smo izvedli za vsak gen ločeno s postopkom »median joining« v programu Network 4.1.0.6 (www.fluxus-engineering.com). V analizo smo vključili le haplotipe *Dina lineata dinarica*, pri čemer nismo upoštevali haplotipov zunanjkov in haplotipov iz geografsko preveč oddaljenih lokalitet, ki bi lahko vplivali na nepreglednost ali popačenje rezultatov.

Rezultati mrežne analize genov za 12S rRNA in COI so prikazani na slikah (11) in (12). V obeh primerih je razvidno, da mrežna analiza haplotipe razporedi v tri večje skupine, ki ustrezajo kladom 1, 2 in 3 v filogenetski analizi (Slike 7-9), zato smo na enak način poimenovali tudi skupine v mrežni analizi haplotipov (sliki 11 in 12).

V mrežni analizi na podlagi gena za 12S rRNA (slika 11) so kot zunanja veja prikazane skupine pijavk iz Kavadarcev (KAV), Ohrida (OHR) in Svetega Nauma v Makedoniji (SVN), mesto koreninjenja na podlagi filogenetske analize in pa se nahaja med skupino 3 na eni ter skupinama 1 in 2 na drugi strani. Mrežna analiza genov za 12S nakazuje začetno naselitev *D. lineata dinarica* v Dinaridih v Hercegovini ter Dalmaciji (skupina 1). Od tu je potekala nadaljnja širitev na zahod v JZ Bosno, proti severu v osrednjo Bosno (skupina 3) in od tu naprej proti jugovzhodu v osrednji del Črne gore in ločeno v J Srbijo. Nazadnje se je vrsta iz J Srbije razširila še v SZ Makedonijo.



Slika 11: Mrežna analiza skupine kladov na podlagi sekvenc genov za 12S rRNA. Velikost krogov ustreza frekvenci haplotipov združenih pod istim imenom.



Slika 12: Mrežna analiza skupine kladov na podlagi sekvenc genov COI. Velikost krogov ustreza frekvenci haplotipov združenih pod istim imenom.

V mrežni analizi na podlagi gena za COI (slika 12) so kot zunanja skupina prikazane pijavke iz Ohrida (OHR), Radožde (RAD) v Makedoniji in Svetega Nauma v Makedoniji (SVN). Mrežna analiza na podlagi gena COI prikazuje drugačne vzorce razširjanja (slika 12) kot analiza 12S gena. V tem primeru naj bi bilo izvorno mesto razširjanja v severni Makedoniji in vzhodni Srbiji (skupina 2), od koder naj bi se pijavke ločeno širile v smeri proti Črni gori, južni Makedoniji (skupina 2), ter v dveh ločenih linijah proti osrednji Bosni. Prva v smeri Kladnja (KLD), Zenice (ZNC) in Vlašića (VLA) (skupina 3) ter druga v smeri preko Vareša (VAR) do Turb (TUR) (skupina 1). Od tu naj bi poseljevanje osrednjih Dinaridov tako potekalo v smeri proti JV Bosni (MIL) neodvisno proti Hercegovini in Dalmaciji.

V našem primeru se mrežni analizi gena za 12S rRNA in gena COI (slika 11 in slika 12) ne skladata z načeli koalescentne teorije (Freeland 2005, Templeton 1998). Poleg tega se rezultati mrežne analize obeh genov razlikujejo, kar kaže na različno hitrost evolucije obeh genov. Vzrok za odstopanje od prvega načela koalescentne teorije (glej poglavje 3.2.5.1) je v obeh primerih neenako število vzorcev z vseh lokalitet. Rezultati so pokazali, da so skoraj vsi haplotipi terminalni, ohranjenih pa je le malo vmesnih, predniških. Haplotipi v skupkih na konceh dolgih vej kažejo, da gre za med seboj dolgo ločene populacije, vmesni predniški haplotipi pa so se izgubili zaradi genskega drifta in mutiranja.

4.3.2 HIERARHIČNA ANALIZA KLADOV

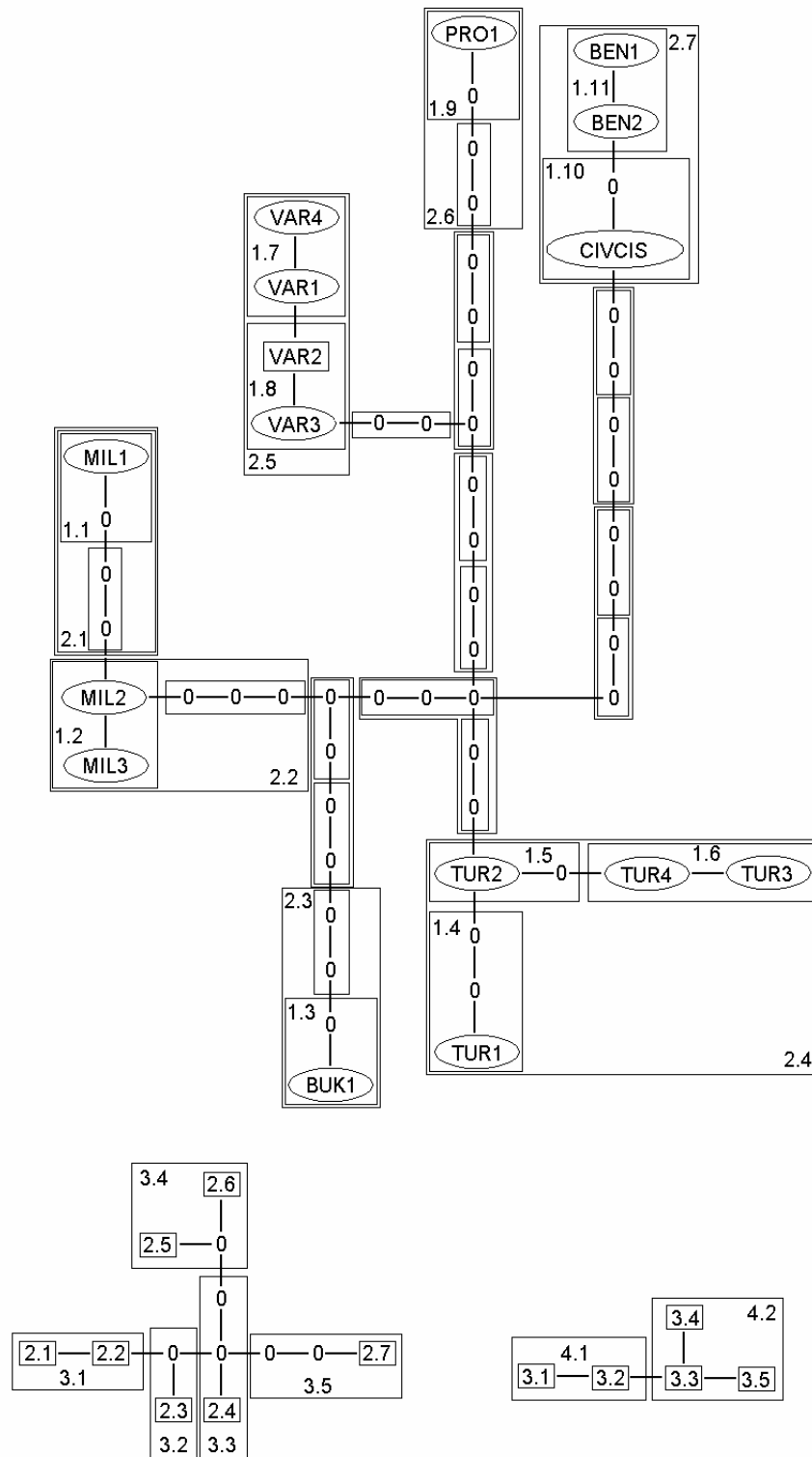
V filogeografsko analizo smo vključili le populacije, ki se med seboj ne razlikujejo za več kot določeno število mutacijskih razlik, saj jih drugače po kriteriju varčnosti ne moremo povezati v mrežo haplotipov (angl. *Statistical parsimony network*). Vključili smo populacije, ki se med seboj razlikujejo za devet mutacijskih korakov pri 12S rRNA in za enajst mutacijskih korakov pri COI. Tako smo pri hierarhični analizi kladov 12S rRNA dobili dve ločeni haplotipski mreži. Prva zajema hrvaški in bosansko-hercegovski klad (slika 13), druga zajema srbsko-makedonski klad (slika 14). Bazalni haplotipi so na slikah prikazani s kvadri.

Hierarhično analizo kladov na podlagi gena za 12S rRNA smo naredili ločeno za obe omenjeni mreži haplotipov. Pri tem smo upoštevali vse manjkajoče, bodisi nevezorčene ali izumrle haplotipe, saj njihova postavitve bistveno vpliva na tvorbo hierarhije (Crandall 1996). Zaradi dolgih vej mreži haplotipov obeh območij na nižjih stopnjah vsebujeta le haplotipe iz istih lokalitet, do združevanja geografsko ločenih haplotipov pa prihaja šele na višjih hierarhičnih stopnjah. Vsaka populacija ima vsaj en specifičen haplotip, kar je dokaz vsaj občasne izoliranosti populacij. Daljši kot je čas izolacije, večje je število specifičnih haplotipov, povečuje pa se tudi delež osebkov s takimi haplotipi.

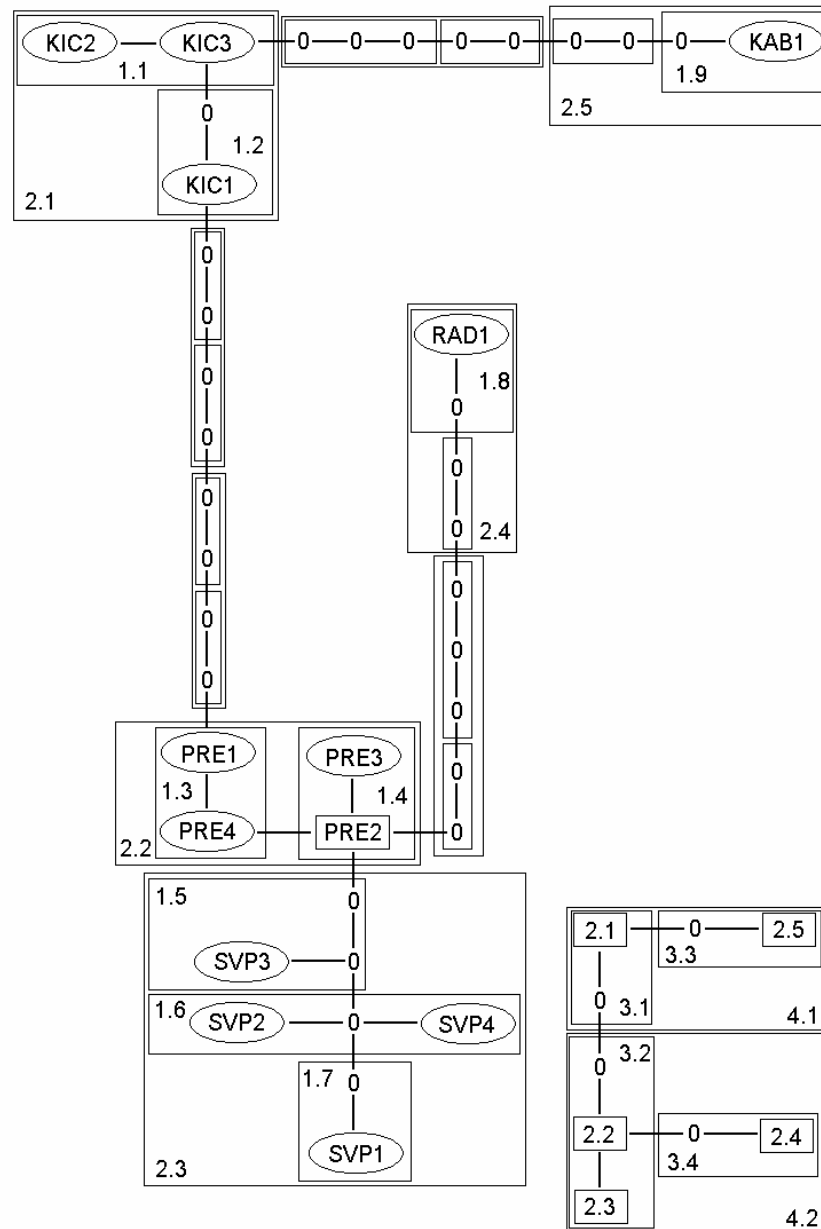
Tako se v mreži, ki zajema hrvaški in bosansko-hercegovski klad (slika 13), bazalno pojavlja haplotip iz Vareša (VAR1) vendar v njej nima centralne pozicije. V hierarhični mreži so centralno manjkajoči haplotipi okoli katerih so ločeno razporejeni haplotipi posameznih lokacij. Do geografskega združevanja pride šele na četrti stopnji. Tako klad četrte stopnje 4.1 združuje bosansko-hercegovski haplotipe iz Miljevine (MIL) in Bukovice (BUK). Klad 4.2 pa združuje hrvaške in preostale bosansko-hercegovski haplotipe.

Druga mreža haplotipov analize 12S rRNA zajema srbsko-makedonski klad (slika 14). V tej mreži se bazalno pojavlja haplotip iz Preševa (PRE), katere haplotipi so v mreži postavljeni centralno. Iz tega lahko sklepamo, da je južna Srbija območje, od koder je bil poseljen jugovzhodni del areala *D. lineata dinarica*. To sovпада tudi z rezultati mrežne analize gena za 12S rRNA (slika 11). Dobili smo dva klada četrte stopnje. Klad 4.1 združuje makedonske haplotipe iz Kičeva (KIC) in Katlanovske Banje (KAB). Klad 4.2 pa združuje makedonske in srbske haplotipe.

Statistično značilnost geografske razporeditve smo s χ^2 testom lahko izračunali za tri od petih analiziranih hrvaških in bosansko-hercegovskih kladov (tabela 2). Na enak način smo statistično značilno geografsko razporeditev na podlagi gena za 12S rRNA ugotovili tudi za tri od štirih analiziranih srbsko-makedonskih kladov (tabela 3).



Slika 13: Hierarhija kladov s 95% podporo za haplotipe iz Hrvaške ter Bosne in Hercegovine na podlagi gena za 12S rRNA. Imena kladov sestavljata dve številki, ločeni s piko. Prva označuje rang, druga pa zaporedno številko klada. Z metodo statistične varčnosti (*statistical parsimony*) so med seboj povezani le haplotipi z manj kot devetimi spremembami v sekvencah.



Slika14: Hierarhija kladov s 95% podporo za haplotipe iz Srbije ter Makedonije na podlagi gena za 12S rRNA. Imena kladov sestavljata dve številki, ločeni s piko. Prva označuje rang, druga pa zaporedno številko klada. Z metodo statistične varčnosti (*statistical parsimony*) so med seboj povezani le haplotipi z manj kot devetimi spremembami v sekvencah.

Tabela 2: Statistična značilnost geografskih vzorcev razporeditve haplotipov na podlagi gena 12SrRNA pijavk Hrvaške ter Bosne in Hercegovine izražena kot vrednosti »p«. Oznake kladov ustrezajo tistim na sliki 12. Verjetnost se nanaša na potrditev ničelne hipoteze o nepovezanosti geografskih vzorcev s kladi. Statistično značilne vrednosti »p« so označene z zvezdico.

Kladi	χ^2 statistika	p
2-7	13.00	0.000*
3-4	8.00	0.020
4-1	7.00	0.052
4-2	54.00	0.000*
Vsi kladi	33.00	0.000*

Tabela 3: Statistična značilnost geografskih vzorcev razporeditve haplotipov na podlagi gena 12S rRNA pijavk Srbije in Makedonije izražena kot vrednosti »p«. Oznake kladov ustrezajo tistim na sliki 13. Verjetnost se nanaša na potrditev ničelne hipoteze o nepovezanosti geografskih vzorcev s kladi. Statistično značilne vrednosti »p« so označene z zvezdico.

Kladi	χ^2 statistika	Verjetnost
3-2	12.00	0.001*
4-1	5.00	0.208
4-2	22.00	0.000*
Vsi kladi	33.00	0.000*

V hierarhični analizi kladov haplotipov pijavk Hrvaške ter Bosne in hercegovine na podlagi gena za 12S rRNA na prvi stopnji in na tretji stopnji ni bilo kladov s statistično značilnimi vzorci (Priloga 1). Na drugi stopnji je bil značilen klad 2-7, ki vključuje vse vzorce pijavk iz Benkovca, Civljan in Ciste Velike. Značilen je bil tudi geografski vzorec v kladu 4-2, ki vključuje vse vzorce pijavk iz Turb, Vareša, Proložca in pijavk iz klada 2-7 (tabela 4). Za oba klada smo ugotovili razširjanje z alopatrično fragmentacijo (tabela 4), kar kaže na to, da je do fragmentacije prišlo že zelo zgodaj. Slednje podpira tudi veliko število mutacijskih korakov med haplotipi.

Pri haplotipih pijavk Srbije in Makedonije na podlagi gena za 12S rRNA ne na prvi stopnji ne na drugi stopnji ni bilo kladov s statistično značilnimi vzorci (Priloga 2). Na tretji stopnji je bil statistično značilen klad 3-2, ki vključuje vse vzorce pijavk iz Preševa in Svete Nedelje. Naslednji značilen klad je bil klad 4-2, ki vključuje vse vzorce pijavk iz Kičeva, Katlanovske Banje, Radožde in vseh vzorcev pijavk iz klada 3-2. Tudi tu smo za oba klada ugotovili alopatrično fragmentacijo (tabela 5).

Tabela 4: Zaporedje korakov v referenčnem ključu in ugotovljeni demografski dogodki na podlagi gena za 12SrRNA za statistično značilne geografske vzorce razporeditve haplotipov pijavk Hrvaške ter Bosne in Hercegovine.

<u>Kladi</u>	<u>Zaporedje korakov</u>	<u>Ugotovljeni demografski dogodki</u>
2-7	1-2-3-5-15-NE	alopatrična fragmentacija
4-2	1-2-3-5-15-NE	alopatrična fragmentacija

Tabela 5: Zaporedje korakov v referenčnem ključu in ugotovljeni demografski dogodki na podlagi gena za 12SrRNA za statistično značilne geografske vzorce razporeditve haplotipov pijavk Srbije in Makedonije.

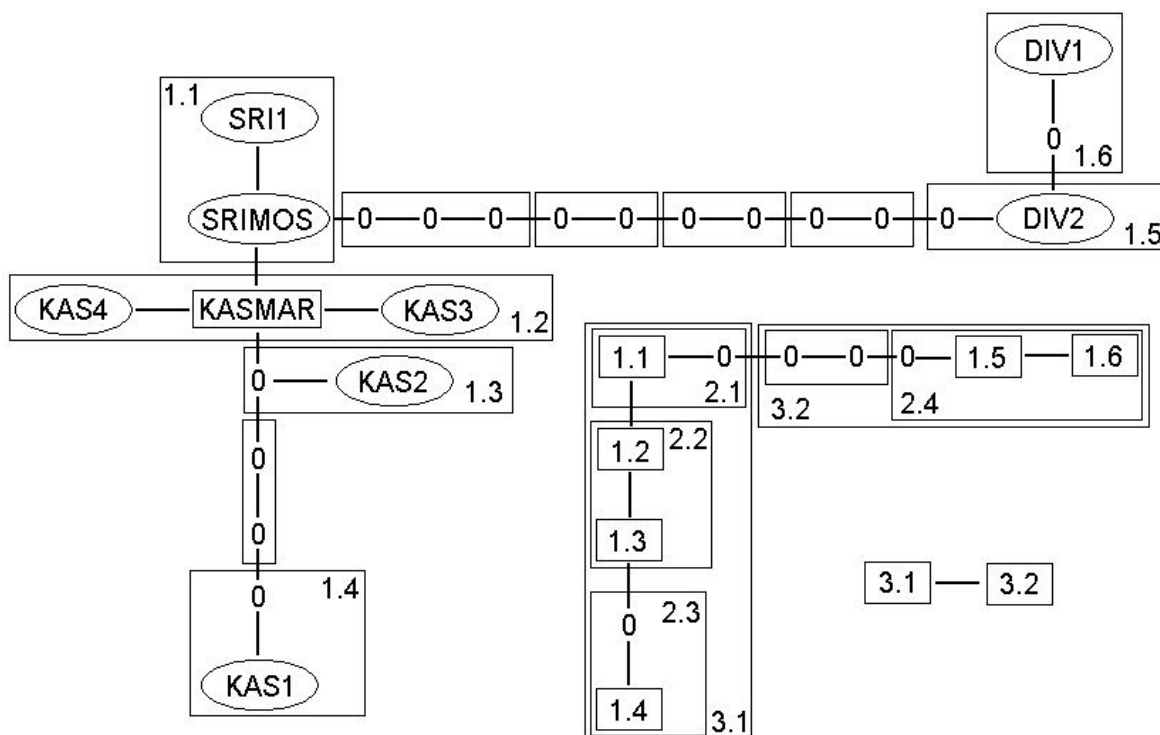
<u>Kladi</u>	<u>Zaporedje korakov</u>	<u>Ugotovljeni demografski dogodki</u>
3-2	1-2-3-5-15-16:DA	alopatrična fragmentacija
4-2	1-2-3-5-15-16:DA	alopatrična fragmentacija

Pri hierarhični analizi kladov na podlagi gena COI smo dobili le eno mrežo haplotipov (slika 15). Vzrok za omejeno število terminalnih haplotipov v hierarhični analizi je v številu povezav med haplotipi, saj metoda s 95% podporo, ki smo jo uporabili, med seboj poveže le haplotipe z manj kot enajstimi spremembami v sekvencah.

V njej se bazalno pojavlja združen haplotip vzorcev iz Kaštela in Marjana pri Splitu (KASMAR), ki ima centralno pozicijo v mreži. Tako lahko sklepamo, da je na geografskem območju, ki ga pokriva mreža, izvorna poselitev širše območje Splita.

Prav tako vsaka populacija vsebuje vsaj en specifičen haplotip, kar je dokaz recentne izoliranosti populacij. Daljši kot je čas izolacije, večje je število specifičnih haplotipov, povečuje pa se tudi delež osebkov s takimi haplotipi.

Pri analizi na podlagi gena COI z vrednostmi χ^2 nismo ugotovili nobene statistično značilne geografske razporeditve.



Slika 15: Hierarhija kladov s 95% podporo za haplotipe iz Hrvaške na podlagi gena COI. Imena kladov sestavljata dve številki, ločeni s piko. Prva označuje rang, druga pa zaporedno številko klada. Z metodo statistične varčnosti (*statistical parsimony*) so med seboj povezani le haplotipi z manj kot enajstimi spremembami v sekvencah.

5. RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 FILOGENETSKA ANALIZA

Na podlagi zaporedij mitohondrijskih genov za citokrom oksidazo I (COI) in gena za 12S rRNA smo ugotavljali filogenetske odnose med populacijami pijavk morfološko definirane podvrste *Dina lineata dinarica*. Analizo smo izvedli na vzorcu 115 pijavk s 33 lokalitet, kot zunanjike pa smo uporabili sekvence obeh omenjenih genov sorodnih pijavk, ki smo jih sekvencirali sami ali pa smo uporabili sekvence, dostopne v javnih podatkovnih zbirkah.

V primeru nekaterih pijavk iz skupine *D. lineata* (npr. *D. lineata lacustris* in *D. lineata monatna*) izoalcija genomske DNA ni bila mogoča zaradi pomanjkanja ali neprimerno shranjenega materiala in tako kljub sorodnosti s preiskovano skupino *D. lineata dinarica* niso bile vključene v filogenetsko analizo. V nekaterih drugih primerih pa kljub večkratnim ponovitvam in optimizacijam postopkov iz izolirane genomske DNA nismo uspeli pomnožiti obeh preiskovanih genov, kar je bila po vsej verjetnosti posledica poškodovane izolirane DNA. Zaradi tega se nabora vzorcev v analizah uporabljenih sekvenc gena COI in gena za 12S rRNA nekoliko razlikujeta.

Kljub neprestanemu razvoju in dodelavam uveljavljanih filogenetskih pristopov so le-ti vseeno podvrženi določenim napakam (Li 1997). V izogib oziroma zmanjšanje teh smo sorodstvene odnose med preiskovanimi pijavkami ugotavljali s tremi različnimi uveljavljenimi filogenetskimi metodami in sicer z metodo varčnosti, metodo največjega soglasja in Bayesovo statistiko. Rezultati filogenetske analize z omenjenimi filogenetskimi metodami so prikazali podobne sorodstvene odnose med primerjanimi haplotipi, kar daje večjo težo ugotovljenim filogenetskim odnosom. Kljub različnim stopnjam evolucijske ohranjenosti genov za 12S rRNA in genov COI (Syvanen 2002) so filogenetska drevesa, izdelana na podlagi ločenih filogenetskih analiz obeh genov, pokazala podobno topologijo in podporo razvejitev, zato smo filogenetsko analizo izvedli tudi na podlagi združenih sekvenc

obeh genov, ki smo ji zaradi večje dolžine in s tem informativnosti pripisali tudi največjo težo (Li 1997).

Rezultati filogenetske analize kažejo na dobro podprto monofilijo klada, ki združuje veliko večino v nalogi analiziranih haplotipov določenih kot *D. lineata dinarica* iz območja Dinarskega krasa. Sestrski klad omenjenemu kladu tvorita monofiletska skupina haplotipov *D. lineata* iz Makedonije, Nemčije in tipskih haplotipov *D. lineata* iz Danske ter monofiletska skupina haplotipov *D. ohridana* in *D. profunda* iz Ohridskega jezera. Obstoječa taksonomija deli *D. lineata* na podlagi morfoloških znakov na podvrste *D. l. lineata*, *D. l. dinarica*, *D. l. montana* in *D. l. lacustris* (Nesemann in Neubert 1999), medtem ko so pijavke iz Ohridskega jezera obravnavane kot samostojne vrste. Rezultati naše filogenetske analize navedene taksonomije ne podpirajo. Kažejo namreč, da so genetske razdalje med kladom *D. lineata dinarica* in ostalimi haplotipi daljše od razdalj med vrstami iz Ohridskega jezera. Iz navedenega sklepamo, da lahko morfološko definirano podvrsto *D. lineata dinarica* obravnavamo kot samostojno vrsto. Podprta je tudi monofilija v analizi uporabljanih haplotipov pijavk z Ohridskega jezera. Za popolnejšo sliko filogenetskih odnosov v rodu *Dina* pa bi bilo v analizo potrebno vključiti tudi nedvoumno determinirane primerke podvrst *D. l. montana* in *D. l. lacustris* ter primerke preostalih vrst iz rodu *Dina* z Ohridskega jezera, kot so *D. lepinja*, *D. krilata*, *D. svilesta*, *D. eturpshem*, *D. lyhnida* in *D. kuzmani*.

Večina haplotipov znotraj klada *D. lineata dinarica* je razporejenih v tri klade, ki z nekaterimi odstopanji ustrezajo geografski razporeditvi lokacij na Dinarskem krasu. Poleg tega so v kladu *D. lineata dinarica* opazne velike genetske razdalje med posameznimi populacijami haplotipov z Dinarskega krasa, ki so v nekaterih primerih celo večje od razdalj med vrstami rodu *Dina*. Slednje kaže na zgodnjo ločitev omenjenih populacij ter nakazuje morebitno kriptično speciacijo (Bickford 2006) znotraj klada *D. lineata dinarica*. Preseneča tudi razporeditev haplotipov pijavk iz osrednje Grčije in Peloponeza v klad *D. lineata dinarica*. To nakazuje možnost, da je areal *D. lineata dinarica* precej širši, saj naj bi po dosedaj poznanih podatkih na jugovzhodu segal le do Makedonije (Sket 1968), relativno velike

genetske razdalje pa tudi v tem primeru kažejo na morebitno kriptično speciacijo znotraj klada *D. lineata dinarica*.

V nasprotju s pričakovanji, so se med zunanjske razvrstili tudi nekateri haplotipi pijavk iz Bosne, ki ustrezajo morfološkem opisu podvrste *Dina lineata dinarica*. Tako se nekateri haplotipi iz Studencev razporejajo kot sestrsko skupino pikasti pijavki *E. octoculata*, skupina haplotipov iz Vlašiča pa tvori sestrsko skupino klada *T. cf. cylindrica* in sorodnim haplotipom iz Francije. Predvidevamo, da gre tudi v tem primeru za napako v determinaciji saj je tako velika genetska pestrost pijavk, ki morfološko ustrezajo opisu *D. lineata dinarica*, le malo verjetna. Primer tako ponovno potrjuje že omenjeno nezanesljivost taksonomije pijavk v družini Erpobdellidae na podlagi morfoloških znakov (Trontelj in sod. 1996, Sket 1968, Trontelj in Sket 2000, Siddall 2002).

Poleg že znanih neskladij med obstoječo taksonomijo in filogenetskimi odnosi znotraj družine Erpobdellidae (Trontelj in sod. 1996, 1999, Siddall in Burreson 1998, Trontelj in Sket 2000, Siddall 2002) pa določena odstopanja od taksonomije kažejo tudi odnosi med haplotipi, ki smo jih v filogenetski analizi uporabili kot zunanjske skupini *D. lineata*. Med slednjimi tako izstopa položaj klada, ki združuje haplotipa vrst določenih kot *T. cf. dalmatina* iz Hrvaške. Ta sta na podlagi naših rezultatov filogenetsko veliko bližje haplotipom iz rodu *Dina*, kot haplotipom rodu *Trocheta*. Čeprav so predhodne filogenetske analize pokazale sorodnost *T. subviridis* s *T. bykowskii*, ki je sinonim za *T. cf. cylindrica* (Trontelj in Sket 2000, Siddall 2002), je ta po vsej verjetnosti posledica slabše taksonomske zastopanosti pijavk in splošno slabo razrešenih odnosov med pijavkami v raziskavi Trontlja in Sketa (2000). Rezultati naše analize kažejo, da se na območju Dinarskega krasa večkrat in neodvisno pojavljajo pijavke z anulacijo, značilno za rod *Trocheta* (Sket 1968), ki pa dejansko sodijo v rod *Dina*. Anulacija, značilna za rod *Trocheta* je tako po vsej verjetnosti homoplazija, kot se je že izkazalo v primeru premestitve vrste *D. krasensis* iz rodu *Trocheta* (Trontelj in Sket 2000).

Rezultati filogenetske analize potrjujejo tudi problematičen položaj *T. cf. cylindrica* in sorodnih haplotipov (Trontelj in Sket 2000, Siddall 2002). Ti se razporejajo

znotraj rodu *Erpobdella*, kar potrjuje že ugotovljano parafilijo rodu *Erpobdella* v trenutnem obsegu, ter podpira potrebo po novi taksonomski ureditvi družine Erpobdellidae (Siddall 2002).

5.1.2 FILOGEOGRAFSKA ANALIZA

Mrežna analiza kladov se je izkazala kot primerna metoda za ugotavljanje filogeografskih odnosov med tesno sorodnimi haplotipi (Bandelt in sod. 1999). Zaradi velike morfološke podobnosti med primerki *Dina lineata dinarica* smo predvidevali tesno sorodnost med preučevanimi haplotipi pijavk, s čimer bi opravičili uporabnost mrežne analize kladov tudi v našem primeru. Izkazalo se je, da so bile razlike med haplotipi bistveno večje, kar je razvidno že iz filogenetskih analiz genov za 12S rRNA in COI. Mrežna analiza kladov je pokazala filogeografsko združevanje haplotipov iz lokacij istih geografskih območij. Vendar sta se analizi na podlagi genov za 12S rRNA in COI med seboj razlikovali, razdalje med skupinami haplotipov pa so bile v določenih primerih zelo velike, kar je privedlo do nepreglednosti rezultata. Filogenetsko zelo oddaljene haplotipe smo zato izvzeli iz analize.

Naslednji korak v filogeografski analizi je hierarhična analiza kladov, v kateri so poleg podatkov, uporabljenih v mrežni analizi, upoštevani tudi geografski in zgodovinski dejavniki (Templeton 1998, Freeman 2005). Metoda temelji na metodi statistične varčnosti, ki ne dopušča analize v primeru velikega števila mutacijskih korakov med populacijami. Zaradi tega so bili v primeru gena COI v mrežo haplotipov združeni zgolj haplotipi iz Hrvaške, medtem ko so bili preostali haplotipi bodisi oddaljeni za več kot enajst mutacijskih korakov, ali pa se niso združevali v skupine iz vsaj štirih različnih lokalitet. Tudi nadaljna analiza mreže haplotipov s Hrvaške ni pokazala statistično značilnega geografskega vzorca razporeditve haplotipov, zaradi česar statistična analiza geografskih parametrov v kladih in ugotavljanje demografskih dogodkov na podlagi gena COI ni bilo mogoče.

V primeru hierarhične analize kladov na podlagi gena za 12S rRNA so bili haplotipi, ki niso bili med seboj oddaljeni več kot devet mutacijskih korakov,

združeni v dve ločeni mreži. V prvi so bili združeni haplotipi s Hrvaške ter Bosne in Hercegovine, druga je združevala haplotipe iz Srbije in Makedonije. Haplotipi iz Črne gore pa zaradi prevelikega števila mutacijskih korakov niso bili priključeni nobeni od obeh mrež. Nadaljna analiza mrež haplotipov je pokazala na prisotnost vsaj nekaterih statistično značilnih geografskih vzorcev razporeditve haplotipov v primeru obeh mrež, iz katerih smo lahko sklepali na potek demografskih dogodkov. Ti so v primerih obeh mrež pokazali na alopatrično fragmentacijo in s tem na fizično ločitev populacije z geografsko prepreko.

Za razliko od nekaterih sorodnih raziskav (Verovnik in sod. 2005) se v nalogi nismo mogli opirati na molekularno uro. Kljub temu pa filogenetski in filogeografski rezultati v nalogi kažejo, da je do poseljevanja območja današnjih Dinaridov z *Dina lineata dinarica* prišlo zelo zgodaj, verjetno še pred začetkom karstifikacije (Radinja 1972). Na daljše časovno obdobje izolacije populacij *D. lineata dinarica* na tem območju kažeta globoka filogenetska razvejitev kladov in relativno velike genetske razdalje med preiskovanimi haplotipi. Hkrati pa filogeografska analiza kaže, da je glavni dejavnik, ki je oblikoval njihovo geografsko razporeditev, alopatrična fragmentacija. Glede na znani potek paleogeografskih dogodkov na območju Balkana in razširjanje haplotipov *D. lineata dinarica* z alopatrično fragmentacijo bi lahko ločitev predniške populacije *Dina* uvrstili v obdobje sredine spodnjega miocena, pred približno 18 milijoni let. V tem obdobju je območje današnjega Balkana prekrival sistem jezer (Rögl in Steininger 1984, Pavelić 2002, Krstić in sod. 2003). Ločitev haplotipov *D. lineata dinarica* na klade, ki v veliki meri ustrezajo njihovi geografski razporeditvi, je tako v skladu s teorijo o oblikovanju ločenih sistemov brakičnih jezer na območju današnjega Dinarskega krasa, ki so nastali ob umikanju Paratetide (Krstić in sod. 2003). Iz alopatrične fragmentacije pijavk *D. lineata dinarica* lahko sklepamo tudi, da je do ločitve populacij in s tem prekinitve pretoka genov med njimi prišlo v relativno kratkem obdobju, saj bi primeru postopnega umikanja morja s filogeografsko analizo po vsej verjetnosti ugotvili druge načine razširjanja haplotipov (Templeton 1998).

Naši rezultati so tako v skladu s sorodnimi študijami razdelitve taksonov z območja Dinarskega krasa *Proteus* in *Troglocaris*, ki prav tako kažejo, da je do glavnih vikariantnih dogodkov po vsej verjetnosti prišlo v sredini miocena (Gorički 2006, Zakšek in sod. 2006, Trontelj in sod. 2007). Poleg tega pa lahko na podlagi filogeografske analize haplotipov *D. lineata dinarica* domnevamo na obstoj ločenih sistemov miocenskih jezer na območju južne Srbije in Makedonije, Črne gore ter večjega povodja na območju Dalmacije, Bosne in Hercegovine.

5.2 SKLEPI

- Filogenetska analiza morfološko definirane podvrste pijavk *D. lineata dinarica* na podlagi genov za 12S rRNA in COI je pokazala skoraj identične sorodstvene odnose med preiskovanimi pijavkami, zato smo te ugotavljali na podlagi združenih sekvenc obeh genov,
- glede na monofilijo klada in genetske razdalje je morfološko definirana podvrsta *D. lineata dinarica* po vsej verjetnosti samostojna vrsta,
- areal vrste obsega Dinarski kras, na jugovzhodu pa sega celo v severno in osrednjo Grčijo,
- znotraj klada *D. lineata dinarica* je opazna velika heterogenost skupin haplotipov, ki v nekaterih primerih celo presega razlike med sorodnimi vrstami, kar kaže na verjetno prisotnost kriptičnih vrst znotraj klada,
- večina haplotipov znotraj klada *D. lineata dinarica* je razporejenih v tri klade, ki z nekaterimi odstopanji ustrezajo geografski razporeditvi lokacij na Dinarskem krasu,
- širše filogenetsko drevo ne podpira trenutne delitve na rodove znotraj družine Erpobdellidae
- filogeografski odnosi *D. dinarica* na Dinarskem krasu, ugotovljeni na podlagi gena za 12S rRNA in COI, so statistično slabo podprti
- vzorec razširjenosti haplotipov *D. lineata dinarica* kaže na alopatrično speciacijo

- glede na vzorce razširjanja bi lahko začetke izolacije populacij *D. dinarica* časovno morda lahko uvrstili v obdobje srednjega miocena, kar je v skladu z vzorci razširjanja nekaterih drugih vrst s podobno razširjenostjo
- vzorci razširjanja *D. lineata dinarica* kažejo na obstoj ločenih povodij v omenjenem obdobju na območju južne Srbije in Makedonije, Črne Gore ter večjega jezerskega sistema na območju Dalmacije, Bosne in Hercegovine
- zaradi velike filogenetske heterogenosti haplotipov *Dina lineata dinarica* ni primeren modelni organizem za ugotavljanje filogeografskih vzorcev razširjanja vodnih organizmov na območju Dinarskega krasa

6. POVZETEK

Pijavke družine Erpobdellidae so pomemben del sladkovodne bentoške favne severne poloble. Območje Dinarskega krasa naseljuje več taksonov iz družine Erpobdellidae, med katerimi je najbolj razširjena morfološko opredeljena podvrsta *Dina lineata dinarica*. Ta poseljuje celotno območje Dinarskega krasa, medtem ko so druge podvrste *D. lineata* na omenjenem območju geografsko zelo omejene ali pa niso bile najdene.

Ločevanje taksonov pijavk na podlagi anatomije in zunanjih morfoloških znakov se je zaradi slabe variabilnosti znakov pri družini Erpobdellidae pokazalo kot neučinkovito. Zato tudi sorodstveni odnosi med vrstami in podvrstami v rodu *Dina* z območja Dinarskega krasa niso povsem pojasnjeni. Prav tako ni pojasnjena zgodovina paleogeografskih in hidroloških dogodkov na območju Dinarskega krasa. Slednje lahko do neke mere razjasnimo s poznavanjem procesov razširjanja vrst, ki jih ugotavljamo s filogeografsko analizo. Pri njej s primerjavo geografskih podatkov in genetskih dreves primernih taksonov ugotavljamo statistično značilne povezave med geografijo in filogenijo ter skušamo razložiti demografske procese, ki so za te povezave odgovorni.

Filogenetsko analizo preiskovanih pijavk smo opravili na podlagi mitohondrijskega gena za 12S rRNA in gena COI. Sorodstvene odnose med 115 haplotipi pijavk, uporabljenimi v analizi, smo ugotavljali z metodo varčnosti, metodo največjega soglasja in Bayesovo statistiko. Drevesa smo koreninili s homolognim zaporedjem vrst *Trocheta cf. cylindrica*, *T. cf. dalmatina*, *Dina latestriata*, *D. profunda*, *D. absoloni*, *Erpobdella mexicana*, *E. testacea* in *E. octoculata*, *D. lineata dinarica* in *D. lineata*.

Tudi filogeografsko analizo pijavk smo opravili na podlagi gena za 12S rRNA in gena COI. V mrežno analizo haplotipov in hierarhično analizo kladov smo vključili le haplotipe pijavk *Dina lineata dinarica* z Dinarskega krasa in sicer 53 haplotipov gena za 12S rRNA ter 64 haplotipov gena COI.

Filogenetska analiza je pokazala monofilijo klada *D. lineata dinarica*. Klad je od sorodnih pijavk ločen s precejšnjimi genetskimi razdaljami. Te so daljše od razdalj med nekaterimi drugimi vrstami v rodu *Dina* kar kaže, da gre v primeru *D. lineata dinarica* po vsej verjetnosti za samostojno vrsto. Njen areal sega preko celotnega Dinarskega krasa do osrednje Grčije na jugovzhodu. Znotraj klada se haplotipi *D. lineata dinarica* z Dinarskega krasa razporejajo v tri ločene klade, ki se z nekaterimi odstopanji ujemajo z njihovo geografsko razporeditvijo. Opazna je tudi velika heterogenost haplotipov znotraj klada, velike genetske razdalje med haplotipi pa nakazujejo morebitno prisotnost kriptičnih vrst znotraj *D. lineata dinarica*.

Mrežni analizi kladov na podlagi gena za 12S rRNA in COI se razlikujeta. S filogeografsko analizo smo ugotovili vzorce razširjanja haplotipov *D. l. dinarica* z alopatrično fragmentacijo. Vzorci razširjanja kažejo na obstoj ločenih jezerskih sistemov na območju južne Srbije in Makedonije, Črne gore ter večjega jezerskega sistema na območju Dalmacije, Bosne in Hercegovine.

Filogeografski odnosi *D. dinarica* na Dinarskem krasu, ugotovljeni na podlagi gena za 12S rRNA in COI, so statistično slabo podprti, mrežni analizi kladov na podlagi obeh genov pa se razlikujeta. Kljub temu je kot vzorec razširjenosti haplotipov hierarhične analize kladov pokazala na alopatrično fragmentacijo. Vzorci razširjanja *D. lineata dinarica* kažejo na obstoj ločenih vodnih sistemov na območju južne Srbije in Makedonije, Črne gore ter večjega jezerskega sistema na območju Dalmacije, Bosne in Hercegovine. Čeprav ne poznamo molekularne ure v naših raziskavah, pa alopatrična fragmentacija in velike genetske razdalje nakazujejo, da bi lahko začetke izolacije populacij *D. dinarica* časovno morda lahko uvrstili v obdobje srednjega miocena, kar je v skladu z vzorci razširjanja nekaterih drugih vrst s podobno razširjenostjo na Dinarskem krasu.

7. VIRI

- Apakupakul K., Siddall M.E., Bureson E.M. 1999. Higher level relationships of leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) based on morphology and gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12: 350–359
- Anholt B. 1986. Prey selection by the predatory leech *Nepheleopsis obscura* in relation to three alternative models of foraging. *Canadian Journal of Zoology*, 64: 649–655.
- Avise J.C., Arnold J., Ball Jr. R.M., Bermingham E., Lamb T., Niegel J.E., Reeb C. A., Saunders N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of the Ecological Systematics*, 18: 489-522
- Avise J.C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Cambridge, ZDA, Harvard University Press, 447 str.
- Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N.S., Ng P.K.L., Meier R., Winker K., Ingram K.K. Das I. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22 (3): 148-155
- Clement M., Posada D., Crandall K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10): 1657-1660
- Crandall K.A. 1996. Multiple interspecies transmissions of human and simian T-cell leukemia/lymphoma virus type I sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 115–131
- Culver C.D., Sket B. 2000. Hotspots of subterranean biodiversity in caves and wells. *Journal of Cave and Karst Studies*, 62(1): 11-17
- Dover T.A., Tautz D. 1986. Conservation and divergence in multigene families: alternative to selection and drift. *Phil. Trans. Roy. Soc. London Ser. B*, 312: 275-289
- Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5): 1792-97
- Fitch W. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change of specified tree topology. *Syst. Zoology*, 20: 406-416
- Freeland J. R. 2005. *Molecular ecology*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.: 388 str.
- Gorički, Š. 2006. Filogeografska in morfološka analiza populacij močerila (*Proteus anguinus*). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta. oddelk za biologijo: 76 str.
- Gorički Š., Trontelj P. 2006. Structure and evolution of the mitochondrial control region and flanking sequences in the European cave salamander *Proteus anguinus*. *Gene*, 387: 31-41
- Govedich F.R., Blinn D.W., Keim P., Davies R.W. 1998. Phylogenetic relationships of three genera of Erpobdellidae (Hirudinoidea), with description of a new genus, *Motobdella*, and species *Motobdella sedonensis*. *Canadian Journal of Zoology*, 76: 2164–2171
- 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
- Harding R.M. 1996. New phylogenies: An introductory look at the coalescent. V: *New uses for new phylogenies*. Harvey P.H. in sod. (ur.), New York Oxford Iniversity press: 15-22
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17: 754–755
- Keane T. M., Creevey C.J., Pentony M.M., Naughton T.J., McInerney J.O. 2006. Assesment of method for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows taha ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evolutionary Biology*, 6: 29
- Krstić N., Savić L., Jovanović G., Bodor E. 2003. Lower miocene lakes of the Balkan peninsula. *Acta Geologica Hungarica*, 46(3): 291-299
- Kumar S., Tamura K., Nei M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150–163
- Li W.-H. 1997. *Molecular evolution*. Sunderland, MA, Sinauer Associates: 487 str.
- Mann, K. H. 1952. A revision of the British leeshes of the family Erpobdellidae etc.. *Proc. Zool. Soc. London*, 122
- McNicol D.K., Mallory M.L., Mierle G., Scheuhammer A.M., Wong A.H.K. 1997. Leeches as indicators of dietary mercury exposure in non-piscivorous waterfowl in Central Ontario, Canada. *Environmental Pollution*, 95: 177–181
- Medlin L., Elwood H.J., Stickel S., Sogin M.L. 1988. The characterisation of enzymatically amplified eucariotic 16S-like RNA coding regions. *Gene*, 71: 491-499
- Moore J.P. 1912. Classification of leeches. V: 'The Leeches of Minnesota'. *Nachtrieb H.F. (ur.) Geological and Natural History Survey of Minnesota: Minneapolis*, 63–150
- Müller K. 2004. PRAP - computation of Bremer support for large data sets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 780-782
- Nesemann H., Neubert E. 1999. *Annelida: Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea. Süßwasserfauna von Mitteleuropa*, 6/2. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag, 178 str.
- Pavelić D. 2002. The south-western boundary of Central Paratethys. *Geologica Croatica*, 55: 83-92
- Pawlowski L.K. 1948. Contribution a la sistematique des sangues du genere *Erpobdella* de Blainville. *Soc. Sci. Lodz, select. III*, 8
- Pawlowski, L.K. 1955. Révision des genres *Erpobdella* de Blainville et *Dina* R. Blanchard (Hirudinea). *Bulletin de la Société des Sciences et des Letteres de Lódz, Classe III de Sciences Mathématiques et Naturelles*, 6: 1–15
- Perret J.L. 1952. Les Hirudinees de la region Neuchateloise. *Bull. Soc. Neuchart. Sci. Nat*, 75
- Posada D., Crandall K.A., Templeton A.R. 2000. Geodis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, 9: 487–488
- Posada D., Crandall K.A. 2001. Intraspecific gene genealogies: Trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, 16 (1): 37-45

- Prelogović E., Arsovski M., Kranjec V., Radulović V., Sikošek B., Soklič S. 1975. Paleogeografska evolucija teritorije Jugoslavije od terciara do danas. *Acta Seismologica Iugoslavica*, 2-3: 7-11
- Rögl F., Steininger F.F. 1984. Neogene Parathethys, Mediterranean and Indo-Pacific Seaways. V: *Fossiles and Climates*. Brenchley E. (ur.), New York, John Wiley & Sons Ltd.: 171-200
- Seaby R.M.H., Martin A.J., Young J.O. 1995. The reaction time of leech and triclad species to crushed prey and the significance of this for their coexistence in British lakes. *Freshwater Biology*, 34: 21–28
- Siddall M.E. 2002. Phylogeny of the leech family Erpobdellidae (Hirudinida : Oligochaeta). *Invertebrate Systematics*, 16: 1–6
- Siddall M.E., Burreson E.M. 1998. Phylogeny of leeches (Hirudinea) based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9, 156–162
- Schlötterer C., Hauser M.–T., van Haesler A., Tautz D. 1994. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophilla*. *Mol. Biol. Evol.*, 11: 513-522
- Sket B. 1968. K poznavanju faune pijavk (Hirudinea) v Jugoslaviji. *Razprave SAZU*, XI/4: 129-197
- Sket B. 1997. Distribution of *Proteus* (Amphibia: Urodela: Proteidae) and its possible explanation. *Journal of Biogeography*, 24: 263–280
- Sket B. 1999. High biodiversity in hypogean waters and its endangerment – the situation in Slovenia, the Dinaric karst, and Europe. *Crustaceana*, 72(8): 767-779
- Sket B., Dovč P., Jalžič B., Kerovec M., Kučinič M., Trontelj P. 2001. A cave leech (Hirudinea, Erpobdellidae) from Croatia with unique morphological features. *Zoologica Scripta*, 30: 223–229
- Soos A. 1966. Identification key to the leech (Hirudinoidea) genera of the world, with a catalogue of the species. III. Family: Erpobdellidae. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 12: 371–407
- Steinbrück G., Schlegel M., Kramer M., Kupfermann H., Willing S. 1991. Identification and phylogenetic analysis of four *Tisbe* species (Copepoda, Harpacticoida) using DNA restriction site variation. *Z. zool. Syst. Evolut. –forsch.*, 29: 393-408
- Swofford D.L. 2000. 'PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.' (Sinauer Associates: Sunderland, MA.)
- Syvanen M. 2002. Rates of Ribosomal RNA Evolution Are Uniquely Accelerated in Eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, 55(1): 85-91
- Templeton A.R., Sing C.F. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*, 134: 659–669
- Templeton A.R., Routman E., Phillips C.L. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Amblystoma tigrinum*. *Genetics*, 140: 767–782

- Templeton A. R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7: 381-397
- Toman M.J., Dall P.C. 1997. The diet of *Erpobdella octoculata* (Hirudinea: Erpobdellidae) in two Danish lowland streams. *Arch. Hydrobiol.*, 140: 549-563
- Trontelj P., Sket B., Dovč P., Steinbrück G. 1996. Phylogenetic relationships in European erpobdellid leeches (Hirudinea: Erpobdellidae) inferred from restriction-site data of the 18S ribosomal gene and ITS2 region. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 34: 85-93
- Trontelj P., Sket B. 2000. Molecular re-assessment of some phylogenetic, taxonomic and biogeographic relationships between the leech genera *Dina* and *Trocheta* (Hirudinea: Erpobdellidae). *Hydrobiologia*, 438: 227-235
- Trontelj P., Sket B., Steinbrück G. 1999. Molecular phylogeny of leeches: congruence of nuclear and mitochondrial rDNA data sets and the origin of bloodsucking. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 37: 141-147
- Trontelj P., Gorički Š., Polak S., Verovnik R., Zakšek V., Sket B. 2007. Age estimates for some subterranean taxa and lineages in the Dinaric Karst. *Acta Carsologica*, 36: 183-189
- Verovnik R., Sket B., Trontelj P. 2004. Phylogeography of subterranean and surface populations of water lice *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Molecular Ecology*, 13: 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: 4355-4369
- Wicklum D., Smith D.E.C., Davies R.W. 1997. Mortality, preference, avoidance, and activity of a predatory leech exposed to cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32: 178-183
- Xia X., Xie Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92: 371-373
- Zakšek V., Sket B., Trontelj P. 2007. Phylogeny of the cave shrimp *Troglocaris*: Evidence of a young connection between Balkans and Caucasus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 223-235
- Zaranko D.T., Griffiths R.W., Kaushik, N.K. 1997. Biomagnification of polychlorinated biphenyls through a riverine food web. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 1463-1471

8. ZAHVALA

Hvala mentorju doc.dr. Rudiju Verovniku za vodenje skozi diplomu in za vse kritike in pohvale.

Hvala članoma komisije prof.dr. Borisu Sketu za nasvete ter natančen pregled naloge in prof. dr. Petru Trontlju za pomoč pri uvajanju v računalniške programe, v delo s pijavkami ter za vse pripombe in predloge.

V laboratoriju mi je bila v neprecenljivo pomoč z nasveti, komentarji, uvajanjem v laboratorij in v samo delo ter za prijetno družbo Valerija Zakšek.
Hvala dr. Maji Zagmajster za pomoč pri natančnem določanju lokalitet, Davidu Stankoviću za uvajanje v delo s pijavkami in Gregorju Bračku za tehnično pomoč v laboratoriju.

Najlepša hvala moji družini, najboljši družini, ki mi je vedno stala ob strani, me vzpodbujala in verjela vame tudi v najtežjih trenutkih.

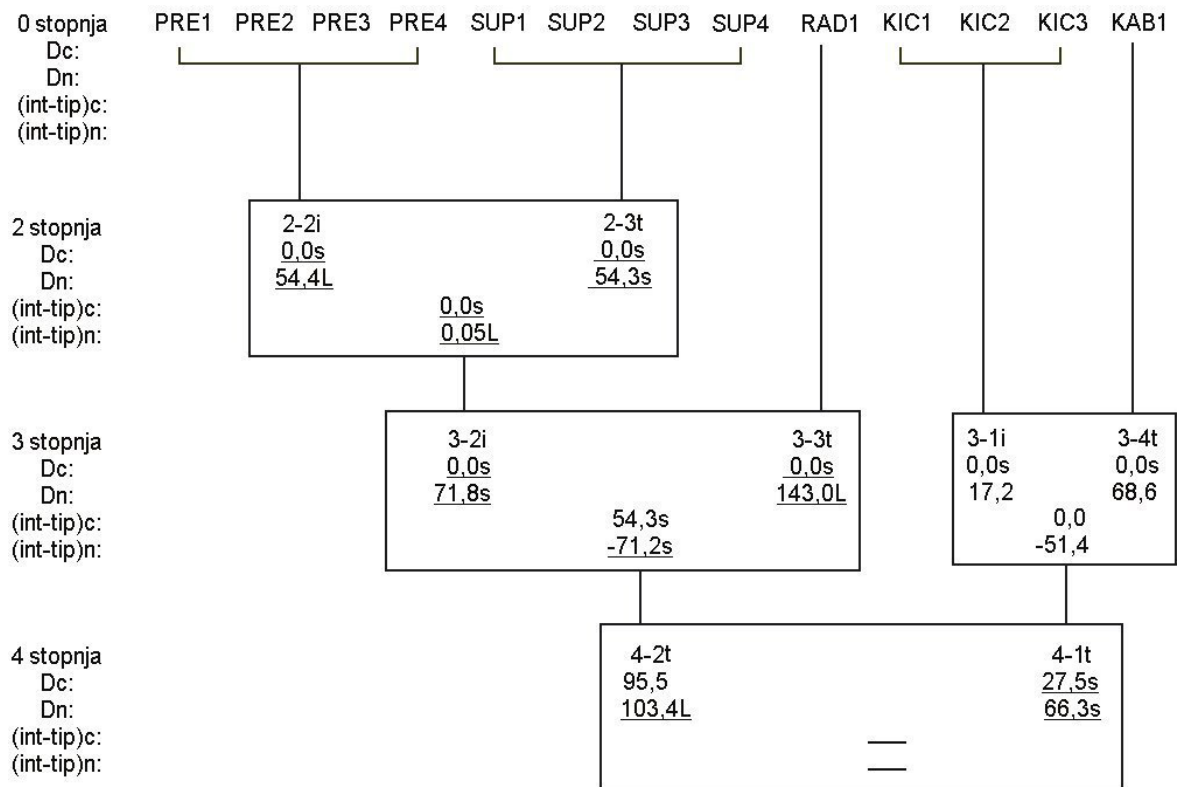
Dragi Rok, ni besed, s katerimi bi se ti lahko zahvalila za vse, kar si naredil zame. Brez tebe mi ne bi uspelo.

Hvala tudi Rokovi mami za veliko pomoč pri pripravi dobrot.

Na koncu pa hvala tudi vsem prijateljem, ki so me znali poslušati, blažiti moje napade slabe volje, bili vedno ob meni, ko sem jih potrebovala in me znali spravljati v smeh in dobro voljo.

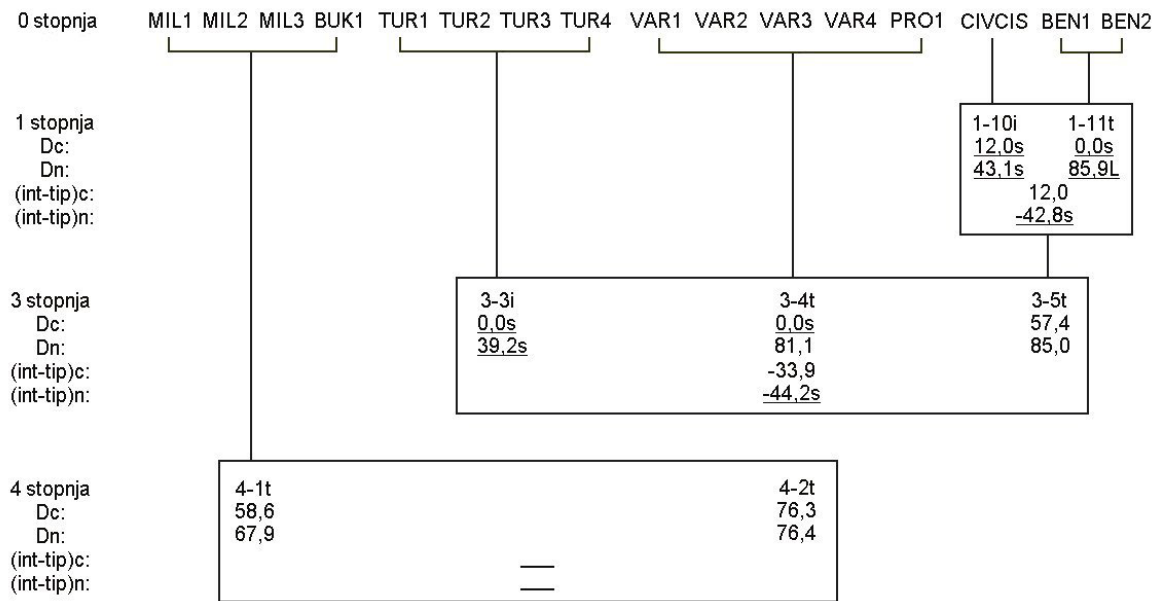
9. PRILOGE

9.1 PRILOGA 1



Statistična analiza geografskih parametrov v kladih (označeni z okvirji) za 12SrRNA iz Srbije ter Makedonije. Statistično značilne geografske razdalje so podčrtane. Pomeni geografskih parametrov Dc, Dn, (int-tip)c in (int-tip)n so razloženi v poglavju metode.

9.2 PRILOGA 2



Statistična analiza geografskih parametrov v kladih (označeni z okvirji) za 12SrRNA iz Hrvaške ter Bosne in Hercegovine. Statistično značilne geografske razdalje so podčrtane. Pomeni geografskih parametrov Dc, Dn, (int-tip)c in (int-tip)n so razloženi v poglavju metode.