

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Miloš VITTORI

**MOŽNOST DOLOČANJA NEKATERIH PROBLEMATIČNIH SKUPIN
SLOVENSКИH JAMSKIH RAKOV NA PODLAGI KRATKIH
ZAPOREDIJ DNA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**POSSIBLE IDENTIFICATION OF SOME PROBLEMATIC
SLOVENIAN CAVE CRUSTACEANS USING SHORT DNA
SEQUENCES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

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: doc. dr. Marjanca Starčič Erjavec
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: 28. 7. 2009

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

Miloš Vittori

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK 595.3(043.2)=163.6
- KG *Asellus*, *Niphargus*, *Troglocaris*, stigobiont, črna koda DNA
- AV VITTORI, Miloš
- SA VEROVNIK, Rudi (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2009
- IN MOŽNOST DOLOČANJA NEKATERIH PROBLEMATIČNIH SKUPIN
SLOVENSКИH JAMSKIH RAKOV NA PODLAGI KRATKIH ZAPOREDIJ DNA
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 45 str., 7 tab., 11 sl., 4 pril., 65 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Molekularno-filogenetske raziskave evropskih jamskih živali kažejo, da imajo te živali razmeroma majhna območja razširjenosti in precejšnjo stopnjo prikrite diverzitete. V zadnjem času se kot način določanja živalskih skupin s težavno morfologijo uveljavlja določanje na podlagi kratkih, standardiziranih zaporedij DNA (črtnih kod DNA). Pri treh rodovih rakov (*Asellus*, *Niphargus* in *Troglocaris*) z jamskimi predstavniki v Sloveniji in širšem območju Dinarskega krasa je bilo pred nedavnim odkritih in opisanih več novih taksonov. Na podlagi uveljavljenih genetskih označevalcev, COI pri rodovih *Asellus* ter *Troglocaris* in 28S rDNA pri rodu *Niphargus*, smo s primerjanjem znotrajvrstnih in medvrstnih genetskih razdalj ter analizo po metodi združevanja sosedov opredelili primernost teh označevalcev za določanje vrst v obravnavanih rodovih. Zaporedja se v vseh primerih razlikujejo med taksoni in njihova raznolikost je znotraj taksonov v povprečju manjša od raznolikosti med taksoni, torej je določanje možno. Vrsta *Asellus aquaticus* je z vidika COI nenavadno raznolika, ena od vrst rodu *Troglocaris* pa je razmeroma slabo ločena od bližnjih taksonov, kar lahko zahteva prilagojen pristop k določanju. Genetske razdalje med nekaterimi pari taksonov rodu *Niphargus* so razmeroma nizke, kar lahko otežuje določanje, vendar to ni nujno. Predlagali smo protokole za določanje vrst.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC 595.3(043.2)=163.6
- CX *Asellus*, *Niphargus*, *Troglocaris*, stygobiont, DNA barcode
- AU VITTORI, Miloš
- AA VEROVNIK, Rudi (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2009
- TI POSSIBLE IDENTIFICATION OF SOME PROBLEMATIC SLOVENIAN CAVE
CRUSTACEANS USING SHORT DNA SEQUENCES
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO X, 45 p., 7 tab., 11 fig., 4 abb., 65 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Molecular phylogenetic studies have recently shown relatively small distribution areas and numerous cases of cryptic diversity in European subterranean fauna. The appliance of short, standardized DNA sequences for species identification (DNA barcodes) has been used to identify morphologically problematic taxonomic groups. In three Dinaric crustacean genera with subterranean representatives (*Asellus*, *Troglocaris* and *Niphargus*) a number of cryptic taxa have recently been discovered. Established genetic identification markers, COI in *Asellus* and *Troglocaris*, and 28S rDNA in *Niphargus*, have been tested for their ability to distinguish species in these groups. Neighbor joining analysis was used and inter- and intraspecific distances were compared to test the feasibility of such an approach. All sampled taxa can be distinguished on the basis of their COI or 28S rDNA sequences. *Asellus aquaticus* shows unusually high COI variability, whereas one *Troglocaris* clade is vaguely separated from its nearest taxa; such cases may require a modified approach to identification. Genetic divergences in some *Niphargus* species pairs were relatively low, which may or may not make the 28S rDNA-based identification of these few species difficult. We developed protocols for identification of selected genera.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo slik.....	VII
Kazalo tabel.....	VIII
Kazalo prilog.....	IX
Kratice	X
1. Uvod.....	1
1.1 Zgodovina črtnih kod DNA.....	1
1.2 Koncept ČKD.....	4
1.3 Problematika uporabe ČKD	6
1.4 Obravnavane živalske skupine	7
1.4.1 Rod <i>Troglocaris</i>	7
1.4.2 Rod <i>Asellus</i>	9
1.4.3 Rod <i>Niphargus</i>	9
1.5 Pomen prikrite diverzitete stigobiontov, uporabnost ČKD in cilji naloge.....	10
2. Materiali in metode	12
2.1 Uporabljena zaporedja DNA.....	12
2.1.1 Rod <i>Troglocaris</i>	12
2.1.2 Rod <i>Asellus</i>	13
2.1.3 Rod <i>Niphargus</i>	14
2.2 Vnosi v BOLD	16
2.3 Testiranje primernosti zaporedij za določanje vrst	17
3. Rezultati	18
3.1 Rod <i>Troglocaris</i>	18
3.2 Rod <i>Asellus</i>	22
3.3 Rod <i>Niphargus</i>	25
3.4 Predlagane metode taksonomskega določanja	28
3.4.1 Pomnoževanje	28
3.4.2 Sekvenciranje	28
3.4.3 Določanje vrst	28

3.4.4 Referenčna zaporedja	29
4. Razprava in zaključki	32
4.1 Razprava.....	32
4.1.1 Primernost določanja na podlagi kratkih zaporedij DNA	32
4.1.2 Metode taksonomskega določanja	34
4.2 Zaključki.....	37
5. Povzetek.....	38
6. Viri.....	40
6.1 Citirani viri	40
6.2 Spletni viri	45
Zahvala	
Priloge	

KAZALO SLIK

Slika 1: Lokalitete vzorčenja rodov <i>Troglocaris</i> in <i>Gallocaris</i>	13
Slika 2: Lokalitete vzorčenja rodu <i>Asellus</i>	14
Slika 3: Drevo rodu <i>Troglocaris</i> , pridobljeno z metodo združevanja sosedov	19
Slika 4: Razširjeno razvejišče skupine »E-slo« - ostala zaporedja.	20
Slika 5: Razširjeno razvejišče skupine »Adriatic«	20
Slika 6: Razširjeno razvejišče vrste <i>T. planinensis</i>	21
Slika 7: Primerjava znotrajvrstne in medvrstne variabilnosti rodu <i>Troglocaris</i>	22
Slika 8: Drevo rodu <i>Asellus</i> , pridobljeno z metodo združevanja sosedov	23
Slika 9: Primerjava znotrajvrstne in medvrstne variabilnosti rodu <i>Asellus</i>	24
Slika 10: Drevo rodu <i>Niphargus</i> , pridobljeno z metodo združevanja sosedov	26
Slika 11: Primerjava znotrajvrstne in medvrstne variabilnosti rodu <i>Niphargus</i>	27

KAZALO TABEL

Tabela 1: Seznam obravnavanih taksonov	15
Tabela 2: Povprečne znotrajvrstne razdalje rodu <i>Troglocaris</i> po modelu K2P	22
Tabela 3: Povprečne znotrajvrstne genetske razdalje pri rodu <i>Asellus</i> po modelu K2P	24
Tabela 4: Povprečne znotrajvrstne genetske razdalje pri rodu <i>Niphargus</i> po modelu K2P	27
Tabela 5: Seznam referenčnih zaporedij za rod <i>Troglocaris</i>	30
Tabela 6: Seznam referenčnih zaporedij za rod <i>Asellus</i>	30
Tabela 7: Seznam referenčnih zaporedij za rod <i>Niphargus</i>	30

KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam uporabljenih zaporedij in lokalitet rodu *Troglocaris*

Priloga B: Seznam uporabljenih zaporedij in lokalitet rodu *Asellus*

Priloga C: Seznam uporabljenih zaporedij in lokalitet rodu *Niphargus*

Priloga D: Pomnoževanje tarčnih nukleotidnih zaporedij

KRATICE

BLAST	<i>basic local alignment search tool</i> ; iskalni algoritem za zaporedja bioloških makromolekul
BOLD	<i>Barcode of Life Data Systems</i> ; spletni sistem za delo s črtnimi kodami DNA
bp	bazni pari
CBOL	<i>Consortium for the Barcode of Life</i> ; »konzorcij za črtno kodo življenja«
COI	<i>cytochrome c oxidase subunit I</i> ; gen za podenoto I citocrom c oksidaze
ČKD	črtna koda DNA
ESU	<i>evolutionary significant unit</i> ; evolucijsko pomembna enota
GPS	globalni pozicijski sistem
ITS	<i>internal transcribed spacer</i> ; medgenska regija, ki ločuje gene za ribosomsko RNA
K2P	<i>Kimura 2-parameter</i> , Kimurin dvoparametrični model
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> ; ameriški center za bioinformatiko
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , verižna reakcija s polimerazo
RAPD	<i>random amplification of polymorphic DNA</i> ; metoda za opredelitev variabilnosti DNA z naključnim pomnoževanjem
rDNA	»ribosomska DNA«, t.j. geni za ribosomsko RNA
SE	<i>standard error</i> , standardna napaka

1. UVOD

1.1 ZGODOVINA ČRTNIH KOD DNA

Izraz »črtna koda DNA« (*DNA barcode*; od tu ČKD) je sicer nekoliko starejši (Floyd in sod., 2002), kot tudi ni tako nov molekularni pristop k določanju organizmov, vsekakor pa je uveljavljanje določanja na podlagi kratkih zaporedij DNA, znanega kot določanje s črtnimi kodami DNA (*DNA barcoding*¹), dobilo zagon z delom Paula Heberta in njegovih somišljenikov po letu 2003 (Valentini in sod., 2008). Hebert in sod. (2003a) so predlagali sistem taksonomskega določanja, temelječ na mitohondrijskem genu za podenoto I citokrom c oksidaze. Za to nukleotidno zaporedje se je prijela kratica COI. Mitohondrijske gene so izbrali zaradi haploidnega značaja mitohondrijskega genoma in odsotnosti intronov, COI pa iz naslednjih razlogov (po Hebert in sod., 2003a): zaporedje je močno variabilno, mutacije so večinoma substitucijskega tipa in ne insercije ali delecije, ki bi otežile uskladitev zaporedij, aminokislinska sestava produkta pa se pri COI spreminja počasneje kot pri drugih mitohondrijskih proteinih. Ob tem naj bi se zaradi robustnih univerzalnih začetnih oligonukleotidov s PCR dalo iz širokega nabora organizmov uspešno pomnožiti zaporedje COI. To nukleotidno zaporedje – standardno je 648 bp dolgo zaporedje na 5' koncu gena (Kerr in sod., 2007) – se je v poznejših preverjanjih pri mnogih skupinah izkazalo kot uporaben označevalec za določanje vrst (Hebert in sod., 2004; Hogg in Hebert, 2004), čeprav to ne velja povsod (Hebert in sod., 2003b; Blaxter in sod., 2005; Neigel in sod., 2007).

Hebert in sod. (2003a) so predlagali začetno izdelavo »profila COI« – drevesa zaporedij COI na podlagi združevanja sosedov (*neighbor joining*). Če začetnemu naboru zaporedij dodamo neznano zaporedje, bi se to po predpostavkah Heberta in sod. moralo uvrstiti najbližje najbolj sorodnemu taksonu. Združevanje zaporedij poteka na podlagi genetskih razdalj, računanih po Kimurinem dvoparametričnem modelu (Kimura, 1980), ker bi naj bil ta najprimernejši, ko so razlike med zaporedji majhne (Hebert in sod., 2003a), in kadar so razlike med pogostostjo tranzicij in transverzij velike, kar velja za mitohondrijski genom (Brown in sod., 1982).

¹Zdi se, da sta v istem izrazu zaobjeta tako pridobivanje, shranjevanje in analiza zaporedij kot njihova dejanska uporaba za določanje organizmov. Paul Hebert (Hebert in sod., 2003a) pristop imenuje tudi mikrogenomska identifikacija (*mikrogenomic identification*); ta izraz je morda primernejši za uporabo v slovenskem besedilu, vendar se nekaterim zdi zgrešen (Will in Rubinoff, 2004).

Po začetnih konferencah v Cold Spring Harborju v letu 2003 je bil leta 2003 začet projekt iBOL (*International Barcode of Life*; <http://www.dnabarcoding.org/>). Leta 2004 (Savolainen in sod., 2005) je s financiranjem Alfred P. Sloan Foundation in pod okriljem Smithsonian Institution sledila še ustanovitev CBOL (*Consortium for the Barcode of Life*; www.barcoding.si.edu), ki združuje organizacije, vključene v projekt ČKD. Od ustanovitve je CBOL organiziral dve mednarodni konferenci na temo ČKD; prvo leta 2005 v Londonu ter drugo v Taipeiju leta 2007. CBOL je začel več obsežnejših kampanj pridobivanja ČKD, usmerjenih zlasti v ekonomsko in družbeno pomembne skupine živali, npr. ptice (ABBI, All Birds Barcoding Initiative, <http://www.barcodingbirds.org/>), čebele (Bee-BOL, Bee Barcode of Life Initiative, <http://www.bee-bol.org/>), ribe (Fish-BOL, <http://www.fishbol.org/>), več v Ward in sod., 2009) in druge (www.barcoding.si.edu).

Hebertova skupina je predvidela, da je za potrebe določanja s ČKD potrebno vzpostaviti novo podatkovno bazo (Hebert in sod., 2003a, Hajibabaei in sod., 2005). Za uporaben globalen sistem, ki bi omogočal široko aplikacijo je namreč pomembno, da sta taksonomska natančnost in kakovost zaporedij preverjeni, zahteva pa se tudi povezava vnešenih zaporedij s shranjenimi izvornimi vzorci (*voucher specimens*). Iz teh razlogov je bila vzpostavljena podatkovna baza BOLD (*Barcode of Life Data Systems*, <http://www.barcodinglife.org>; Ratnasingham in Hebert, 2007). Baza omogoča hrambo podatkov o ČKD ter vzorcih, iz katerih so bile pridobljene, obenem pa tudi analizo podatkov (tvorbo drevesa za izbrana zaporedja po metodi združevanja sosedov, analizo distanc, analizo nukleotidne sestave zaporedij) ter iskalnik (*identification engine*), ki omogoča določanje organizmov preko njihovih zaporedij COI (Ratnasingham in Hebert, 2007, <http://www.barcodinglife.org>). Iskalnik je najprej uporabljal algoritem BLAST (Hajibabaei in sod., 2005), kar pa so pozneje nadomestili z linearnim iskanjem (Ratnasingham in Hebert, 2007). Začetni (Hebert in sod., 2003a) pristop z dendrogramom za sam pripis zaporedja vrsti ni privzeta možnost, je pa mogoč naknadno. Če neznan zaporedje divergira od najbolj podobnega v bazi za manj kot 1 %, se ga dodeli vrsti (če je vrsta v bazi), če med 1 % in 3 %, rodu, če od ostalih vnosov divergira za več kot 3 %, pa iskalnik poda taksonomsko uvrstitev 100 najbližjih sosedov. V primeru, da so divergence več vrst od neznanega zaporedja manjše kot 1 %, so prikazane vse možne uvrstitve novega zaporedja (Ratnasingham in Hebert, 2007). Določanje je trenutno možno preko COI ter jedrnih ribosomskih nukleotidnih zaporedij ITS (*internal transcribed spacer*).

Za minimalni vnos v sistem sta potrebna le oznaka vzorca ter taksonomska uvrstitev do debla, za pridobitev statusa ČKD pa je bilo predvideno, da bi bili posredovani naslednji podatki (Ratnasingham in Hebert, 2007):

- vrstno ime,
- podatki o izvornem vzorcu (njegova oznaka in naziv ustanove, kjer je shranjen),
- podatki o vzorčenju (oseba, ki je vzorčenje opravila, datum in lokaliteta s koordinatami),
- določevalec vzorca,
- zaporedje COI, dolgo vsaj 500 bp,
- začetni oligonukleotidi za PCR, s katerimi je bilo nukleotidno zaporedje pomnoženo (ti morajo biti predhodno registrirani),
- kromatogrami sekvenciranja (*trace files*); v bazo jih je možno zaenkrat vnesti le kot .ab1 datoteke, dodane pa bi naj bile tudi datoteke *phred*, preko katerih se točkjuje kakovost kromatograma, vendar to ovrednotijo tudi brez omenjenih datotek, zato niso nujne.

Trenutno so kriteriji nekoliko prilagojeni: koordinate lokalitete, datum vzorčenja ter oseba, ki je vzorčila, niso več obvezni, dodan pa je kriterij, da mora nukleotidno zaporedje vsebovati manj kot 1% neidentificiranih baznih parov. Vsaj za živalske ČKD je obvezno zaporedje COI, ki je primarni označevalec za živalsko kraljestvo, sistem pa dopušča tudi drugotne označevalce (<http://www.barcodinglife.org/>). Zaenkrat lahko v bazi najdemo kot drugotna označevalca še ITS in 28S rDNA. Verjetno bodo sistem v prihodnosti še dopolnili (Ratnasingham in Hebert, 2007).

Nukleotidna zaporedja lahko dobijo oznako črtne kode (»BARCODE«) tudi v bazi GenBank. Kriteriji so podobni tistim v BOLD (Hanner, 2005), vnos pa je možen preko posebnega spletnega orodja (*Barcode Submission Tool*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/index.cgi?tool=barcode>). Oznako lahko dobijo le zaporedja COI.

1.2 KONCEPT ČKD

V začetnem članku Heberta in sod. (2003a) se ČKD nanašajo na taksonomski identifikacijski sistem, sloneč na zaporedjih COI. Takšno opredelitev ČKD lahko najdemo tudi drugje (Neigel in sod., 2007). Kljub temu pa je določanje s ČKD ponekod definirano le kot taksonomska identifikacija na podlagi kratkih, standardiziranih zaporedij DNA (Dasmahapatra in Mallet, 2006; Hajibabaei in sod., 2005; Ward in sod., 2009; Kress in Erickson, 2008) oz. le enega standardnega zaporedja (Rubinoff in sod., 2006, Hajibabaei in sod., 2007).

Valentini in sod. (2008) pojem določanja s ČKD delijo na določanje s ČKD v širšem in ožjem smislu. Določanje s ČKD v ožjem smislu (*sensu stricto*) se nanaša na identifikacijo vrst na podlagi enega samega standardnega zaporedja DNA (pristop Hebertove skupine), medtem ko določanje s ČKD v širšem smislu (*sensu lato*) označuje identifikacijo na kakršnemkoli taksonomskem nivoju na podlagi kateregakoli zaporedja DNA, tudi če ni priznana standardna ČKD. Za določanje organizmov so bila uporabljena tudi druga nukleotidna zaporedja, npr. jedrno zaporedje ITS ter jedrni in mitohondrijski geni za razne podenote ribosomske RNA (Blaxter, 2004). Drugi menijo, da preveliko posploševanje lahko vodi v zamenjevanje pojma uporabe ČKD z molekularno sistematiko na splošno (Hebert in Gregory, 2005; Brower, 2006).

Po Vences in sod. (2005) mora zaporedje DNA zadovoljiti naslednje kriterije, da je uporabno kot črtna koda za določanje organizmov:

- biti mora dovolj variabilno, da omogoča ločevanje vrst med sabo, ter dovolj ohranjeno, da je znotrajvrstna variabilnost manjša od medvrstne;
- vezavna mesta začetnih oligonukleotidov pri pomnoževanju s PCR morajo biti dovolj ohranjena, da je ampfikacija izvedljiva za vse vrste ciljne taksonomske skupine;
- vsebovati mora dovolj filogenetske informacije, da je možno pripisati osebek širši skupini s preprostimi distančnimi metodami²;
- pomnoževanje in sekvenciranje morata biti čim bolj robustna (konsistentna);

²Distančne metode so bile za določanje običajno predlagane v literaturi in uporabljene pri študijah primernosti določanja s ČKD, se pa omenja tudi možnost uporabe metod, ki slonijo na znakih (DeSalle in sod., 2005; Sarkar in sod., 2008).

- uskladitev zaporedja mora biti možna tudi z oddaljenimi taksoni.

Podobne kriterije za primernost uporabe nekega zaporedja kot ČKD so ponudili tudi drugi (Hebert in sod., 2003a; Blaxter, 2004; Kress in sod., 2005).

COI se je pri živalih kot označevalec uveljavil, medtem ko so za rastline in glive predlagali druga zaporedja DNA; pri glivah je to ITS (Nilsson in sod, 2008), se pa tudi tu omenja COI (Seifert in sod., 2007), medtem ko pri rastlinah glede označevalcev ni dogovora. Sprva je bila za rastline predlagana kombinacija ITS in kloroplastnega gena *trH-psbA* (Kress in sod, 2005), pozneje pa so bili objavljeni drugi predlogi, npr. kombinacija *trH-psbA* ter *rbcL* (več predlogov je povzetih v Pennisi in sod., 2007 ter Lahaye in sod., 2008). Nekateri avtorji so tudi pri živalih predlagali uporabo drugih označevalcev namesto COI, ker so se pri nekaterih skupinah izkazali za uporabnejše od COI, npr. pri dvoživkah (Vences in sod, 2005). Pomnoževanje COI s PCR tudi ni dovolj uspešna pri vseh skupinah (Blaxter, 2004, Kress in sod., 2005; Bhadury in sod., 2006; Vences in sod., 2005; Blaxter in sod., 2005). Zaporedje COI se je izkazalo za neuporabno pri določanju ožigalkarjev zaradi premajhne variabilnosti mitohondrijskega genoma pri tej skupini (Hebert in sod., 2003b, Shearer in Coffroth, 2008), z zaporedji ribosomskih genov je nadomeščeno pri glistah, kjer je določanje taksonov na podlagi zaporedij DNA precej uveljavljeno (Floyd in sod., 2002; Holterman in sod., 2008). Pojavlja se tudi mnenje, da bi mitohondrijske označevalce morali dopolniti z jedrnimi, ker spremembe v mitohondrijskem genomu ne odsevajo nujno dejanskih filogenetskih procesov (Dasmahapatra in Mallet, 2006; Will, 2005). Kljub vsemu se zdi, da Hebertova skupina vsaj konceptualno vztraja pri COI kot enotnem označevalcu, pa čeprav na račun nezmožnosti ločevanja nekaterih taksonov (Hebert in Gregory, 2005; Hajibabaei in sod., 2007). CBOL sicer na svojih straneh priporoča uporabo dodatnega označevalca, če COI ni zadosten za določitev do vrste, in dopušča možnost dodelitve drugačnega standardnega označevalca pri skupinah, za katere COI ni uporaben kot ČKD; objavili so tudi kriterije za dodelitev drugih označevalcev in priporočila za objavo argumentov za tak korak (<http://www.barcoding.si.edu/PDF/Guidelines%20for%20non-CO1%20selection%20FINAL.pdf>).

Pomen uporabe zaporedij DNA za določanje biološkega materiala je v možnosti zanesljivega določanja taksonov, med katerimi ni jasno opredeljivih morfoloških razlik ter določanja organizmov v vseh razvojnih stopnjah (Hebert in sod., 2003a; Savolainen in sod., 2005; Floyd

in sod., 2002). Uporaben je tudi pri analizi prehrane živali, zlasti če se hranijo s tekočo hrano (Valentini in sod., 2008), ter pri nadzoru živil (Valentini in sod., 2008; Ward in sod., 2009) in trgovine z ogroženimi vrstami (Savolainen in sod., 2005, Valentini in sod., 2008). Precej se omenja še možnost ugotavljanja diverzitete v okoljskih vzorcih na podlagi analize označevalskih zaporedij DNA (Holterman in sod., 2008; Neigel in sod., 2007)

1.3 PROBLEMATIKA UPORABE ČKD

Meyer in Paulay (2005) sta zaključila, da se uporaba ČKD za določanje vrst obnese pri dobro preučenihi taksonomskih skupinah, medtem ko pri skupinah z manj dorečeno taksonomijo ni uspešna – za učinkovito določanje morajo torej biti v skupini najprej pravilno definirane vrste. Slabo določljive so tudi »mlade vrste« (Meyer in Paulay, 2005; Kerr in sod., 2007). Da je določanje na podlagi zaporedij DNA učinkovito, je nujna jasna meja med znotrajvrstno in medvrstno variabilnostjo zaporedja in preprost test za ta pogoj bi naj bilo primerjanje genetskih razdalj znotraj vrst in med njimi. Če so genetske razdalje med zaporedji znotraj vrst manjše od razdalj med zaporedji različnih vrst, prekrivanja variabilnosti ni (Kerr in sod., 2007). Prekrivanje znotrajvrstne in medvrstne raznolikosti zaporedij COI je bilo sicer že opaženo (Moritz in Cicero, 2004; Meyer in Paulay, 2005; Vences in sod., 2005). Najpomembneje je, da si pari vrst ne delijo identičnih zaporedij, kar pa se tudi dogaja (Kerr in sod., 2007, Ward in sod., 2008).

V povezavi s ČKD je tudi predlog DNA-taksonomije (Tautz in sod., 2003; Blaxter, 2004), čeprav avtorji, ki so jo predlagali, zagovarjajo drugačne metode in sisteme označevalcev. Po Tautzu in sod. (2003) bi bila vsaki biološki vrste pripisana referenčna zaporedja DNA, vlogo tipskih primerkov bi dopolnili tipski izolati DNA, vsi potrebni podatki pa bi bili dostopni preko spleta, medtem ko bi Blaxterjeva DNA-taksonomija slonela na molekularnih operativnih taksonomskih enotah (MOTU; *molecular operational taxonomic unit*), ki bi ustrezale vrstam tradicionalne taksonomije (Floyd, 2002; Blaxter 2004). Takšnim predlogom nekateri močno nasprotujejo in se zavzemajo za *integrativno* taksonomijo, ki bi poleg molekularnih podatkov upoštevala tudi morfološke, ekološke in druge pristope k opisovanju pestrosti (Will in Rubinoff, 2004; Will in sod., 2005). CBOL se je odmaknil od idej o DNA-taksonomiji in zagovarja stališče, da so ČKD zgolj uporabno orodje znotraj obstoječe taksonomske prakse (Schindel in Miller, 2005). Predlog uporabe ČKD kot pripomočka za

oddeljevanje novih vrst (npr. na podlagi divergenčnega praga – desetkratna povprečna znotrajvrstna divergenca v taksonomski skupini je prag za oddelitev vrste), kot to predlagajo Hebert in sod. (2003a; 2004), je sprožil veliko polemik. Kritike letijo tako na metodologijo (distančne metode iskanja filogenij so fenetske) kot na nezadostnost COI za definiranje taksonov (DeSalle in sod., 2005; Will in sod., 2005), prag divergence pa se ne obnese zaradi velikih razlik v znotrajvrstni in medvrstni variabilnosti med taksonomskimi skupinami (Will in sod., 2005; Nilsson in sod., 2008) ter ker je število obravnavanih zaporedij pogosto prenizko, geografsko območje vzorčenja pa premajhno, da bi bila možna zadostna ocena znotrajvrstne raznolikosti (Will in sod., 2005; Dasmahapatra in Mallet, 2006, Meyer in Paulay, 2005). Odgovor zagovornikov je, da ČKD ne pomagajo pri ugotavljanju globljih filogenetskih odnosov, kar tudi ni njihov namen, da pa lahko pokažejo na genetsko ločene skupine organizmov (Hebert in Gregory, 2005; Hajibabaei in sod., 2007). Za opis vrste naj zgolj ČKD ne bi zadoščale (Hebert in sod., 2003, Hebert in Gregory, 2005), množica zaporedij COI, pridobljena za namene določanja, pa je lahko uporabna v filogenetskih študijah (Hajibabaei in sod., 2007).

1.4 OBRAVNAVANE ŽIVALSKÉ SKUPINE

V zadnjem času so molekularno-filogenetske raziskave skupin velikih jamskih vodnih živali (makrostigobiontov) z nenavadno obsežnimi areali razkrile precej prikrité diverzitete jamske favne. Prej neopisane, vendar molekularno ločene geografske skupine so bile odkrite pri vodnem osličku (rod *Asellus*; Verovnik in sod., 2005, 2009), slepih postranicah (rod *Niphargus*, Trontelj in sod., 2009), jamskih kozicah (rod *Troglocaris*; Zakšek in sod., 2007, 2009) ter pri močerilu (rod *Proteus*; Trontelj in sod., 2009).

1.4.1 Rod *Troglocaris*

Taksonomija rodu *Troglocaris* (Decapoda, Atyidae) je bila nestabilna že v preteklosti (Zakšek in sod., 2007), molekularno-filogenetski pristop na podlagi COI, ITS ter 16S in 28S rDNA (Zakšek in sod., 2007, 2009) pa je pokazal naslednje: *Troglocaris inermis*, vrsta z juga Francije, predstavlja neodvisno skupino in je sorodnejša španski površinski kozici *Dugastella valentina* kot kateri od drugih vrst rodu *Troglocaris*; rod *Spelaeocaris* iz Bosne in Hercegovine je del rodu *Troglocaris*, ta rod pa se deli na dve geografski skupini, tipsko

»Anophthalmus« (zajema nekdanji kompleks *T. anophthalmus* in ima holodinarsko razširjenost (Sket in Zakšek, 2009)) ter dinarsko-kavkaško, ki združuje ostale balkanske taksone (*Spelaeocaris pretneri*, *T. hercegovinensis*, *T. intermedia*) ter skupino vrst s Kavkaza (*T. katussiana*, *T. ablaskiri*, *T. fagei*, *T. osterloffii*). Ob tem se *T. anophthalmus* razdeli v več kladov ki so v Zakšek in sod. (2007, 2009) imenovani bosanski (»Bosnian«, ta je sestrski vsem ostalim), vzhodnoslovenski (»E-slo«), zahodnoslovenski (»W-slo«), jadranski (»Adriatic«) in »Soča«, možen pa je tudi obstoj dodatnega klada (»Istra«, Zakšek in sod., 2009). Ti kladi, razen bosanskega, so molekularno sicer le nekoliko ločeni, geografsko pa dobro (Sket in Zakšek, 2009). Poleg teh so Zakšek in sod. (2007) ugotovili obstoj jasno ločenega klada, sestrskega *S. pretneri* (»Para-pretneri« v Zakšek in sod., 2007). Novi podatki so upoštevanji v reviziji taksonomije rodu (Sket in Zakšek, 2009); bivši *T. inermis* je oddeljen od rodu *Troglocaris* in nosi novo ime *Gallocaris inermis*; v skupini »Anophthalmus« je klad »Bosnian« Zakšek in sod. (2007) opisan kot nova vrsta *T. bosnica*, klad »W-slo« pa poimenovan kot – nekoč že opisana – vrsta *T. planinensis* (vrsta morfološko ni določljiva in je zelo variabilna). Dodatne vrste so še *T. prasence* (ustreza »Para-pretneri« kladu Zakšek in sod.), *T. kapelana*, *T. neglecta* (obe vrsti sta v molekularnih analizah zastopani s sicer neobjavljenimi zaporedji avtorjev D. Franjevića in S. Gottstein), ločena pa je tudi neopisana vrsta, označena le kot *Troglocaris* sp. Molekularna filogenija za skupino sovpada z geografsko razširjenostjo posameznih kladov (Sket in Zakšek, 2009). Tudi drugi kladi skupine »Anophthalmus« izpolnjujejo več kriterijev za njihovo oddelitev kot ločene vrste, če ne drugega predstavljajo vsaj naravovarstveno pomembne evolucijske enote (Zakšek in sod., 2009) oz. ESU (*evolutionary significant units*; gre za skupine osebkov, ki kažejo močno omejen genski pretok med njimi in drugimi skupine znotraj vrste; Frasier, 2001)

Pri rodu *Troglocaris* so morfološke razlike med taksoni nejasne, določevalni znaki pa maloštevilni in pogosto homoplastični, čeprav niso v nesoglasju z molekularnimi podatki. Nekateri znaki, ki so bili prej za sistematiko rodu pomembni, na primer dolžina rostruma in stopnja redukcije oči, so brez prave vrednosti za določanje jamskih kozic. Skupina »Anophthalmus« je morfološko variabilna, vendar ta variabilnost ne sovpada niti z molekularno niti z geografsko delitvijo skupine (Sket in Zakšek, 2009).

1.4.2 Rod *Asellus*

Vodni osliček (*Asellus aquaticus*; Isopoda, Asellidae) je razširjen po večjem delu Evrope, na območju Dinaridov pa je zastopan z več morfološko utemeljenimi podvrstami (Sket, 1994). Molekularne raziskave na podlagi COI, 28S rDNA ter RAPD (Verovnik in sod., 2003, 2004, 2005) so pokazale, da je morfološko utemeljena delitev na podvrste umetna ter da so troglomorfne značilnosti podzemeljskih populacij (podvrste *A. aquaticus cavernicolus* iz Postojnsko-planinskega jamskega sistema ter severa Italije) tudi na omejenem območju severozahodnih Dinaridov najverjetneje nastale večkrat neodvisno. Obsežna filogeografska študija na podlagi COI ter 28S rDNA, ki je vključila vzorce iz praktično celotnega območja razširjenosti vrste v Evropi in vseh večjih porečij, kjer je vrsta prisotna (Verovnik in sod., 2005), je pokazala veliko pestrost zaporedij COI (celo znotraj populacij) in jasno genetsko ločenost populacij severozahodnih Dinaridov ter populacije iz jame Labodnice (Grotta di Trebiciano) v Italiji od ostalih evropskih populacij. Obstajajo tudi druge skupine zaporedij COI iz srednje in jugovzhodne Evrope, ki pa jih filogenija na podlagi 28S rDNA ne podpira kot ločene evolucijske enote. Troglomorfna populacija iz Labodnice je bila pred kratkim opisana kot ločena vrsta, *A. kosswigi*³ (Verovnik in sod., 2009).

1.4.3 Rod *Niphargus*

Rod *Niphargus* (Amphipoda, Niphargidae) je vrstno najbolj pester rod sladkovodnih postranic (Väinölä in sod., 2008), njegova taksonomija pa je potrebna revizije (Fišer in sod., 2008). Rod je bil obsežno preučen tako morfološko (Fišer in sod., 2008) kot molekularno (Lefébure in sod., 2006, 2007, Fišer in sod., 2008; Trontelj in sod., 2009). Globlji filogenetski odnosi znotraj rodu so v veliki meri še neznanka (Fišer in sod., 2008), se je pa pokazalo, da so morfološko utemeljene skupine znotraj rodu umetne (Fišer in sod., 2008), ter da že tako pester rod skriva tudi precej prikrite diverzitete (Lefébure in sod., 2006, 2007; Fišer in sod., 2008, Trontelj in sod., 2009). Več vrst sestavlja zahodnoevropska taksona *N. virei* in *N. rhenorhodanensis* (Lefébure in sod., 2006, 2007), ter *N. aquilex*, *N. longicaudatus*, *N. longidactylus*, *N. fontanus* in *N. tauri*, če naštejemo le tiste, pri katerih je bilo ugotovljeno največ prej neznanih kladov (Trontelj in sod., 2009; pri teh skupinah je potrebno še

³Vrsta živi v podzemeljskem toku Reke, primerki so bili izven Labodnice najdeni tudi v izviro Timave pri Trbižu, kjer sobiva z vrsto *A. aquaticus*.

natančnejše sistematsko delo). Verjetno je, da drugi, manjši, rodovi družine niso ločeni od rodu *Niphargus*, kar vsekakor velja za rod *Niphargopsis*. Tudi bodoča sistematika je verjetno odvisna v največji meri od molekularnih podatkov, saj filogenija tudi tu bolj odraža geografsko distribucijo kot morfologijo (Fišer in sod., 2008).

Pri rodu *Niphargus* so molekularne raziskave temeljile v glavnem na 28S rDNA (Fišer in sod., 2008; Trontelj in sod., 2009; Lefébure in sod., 2006, 2007), dodatno pa so uporabili še mitohondrijske označevalce 12S rDNA (Fišer in sod., 2008), 16S rDNA (Lefébure in sod., 2007) in COI (Lefébure in sod., 2006, 2007). COI in mitohondrijske gene nasploh je pri tem rodu težavno pomnožiti s PCR, pri taksonih, kjer je pomnoževanje uspelo, pa je bilo to nekonsistentno in so bile zanj potrebne različne kombinacije posebej oblikovanih začetnih oligonukletidov (Fišer in sod., 2008; Lefébure in sod., 2007).

1.5 POMEN PRIKRITE DIVERZITETE STIGOBIONTOV, UPORABNOST ČKD IN CILJNALOGE

Vse omenjene molekularne raziskave sistematike stigobiontov kažejo, da so areali posameznih taksonov obravnavanih skupin manjši in da sta stopnja endemizma ter biodiverziteta v podzemnem vodnem okolju večji, kot je bilo znano prej. Ta spoznanja so pomembna z naravovarstvenega vidika. Ne samo, da so podzemeljske vrste zaradi svojega ozkega endemizma in vezanosti na omejen življenjski prostor bolj ranljive (Lefébure in sod., 2007), za ohranjanje podzemeljske biodiverzitete so potrebne drugačne, bolj globalne varstvene strategije (Lefébure in sod., 2006, Trontelj in sod., 2009). Številna skupine teh živali so evolucijsko mlade, kar otežuje tako morfološko kot molekularno taksonomsko delo s temi skupinami, to pa govori v prid integrativnemu pristopu k sistematiki (Trontelj in sod., 2009).

V nekaterih primerih so z molekularnimi metodami odkriti taksoni morfološko določljivi in so bili spregledani zaradi posvečanja pozornosti neustreznim morfološkim znakom, spet druge pa ni znanih načinov morfološkega določanja živali do zaželenega nivoja (Sket in Zakšek, 2009, Trontelj in sod., 2009). V primeru, da se diverzitete resnično ne more spoznavati preko morfologije, so za natančno določanje materiala potrebni molekularni pristopi. Uporaba ČKD pri tukaj obravnavanih skupinah stigobiontov je glede na trenutno stanje njihove taksonomije

primerna iz dveh razlogov: prvič, omogoča lahko zanesljivo določanje sicer nedoločljivega ali težko določljivega materiala, tudi če je poškodovan ali če gre za spolno nezrele osebk; drugič, v skupinah, ki so z molekularnega vidika še nepopolno raziskane, bi lahko ČKD pokazale na primere morebitne prikrite diverzitete, vredne nadaljnje pozornosti.

V diplomski nalogi poskušamo ugotoviti, ali se ČKD dobro obnesejo pri določanju treh rodov jamskih rakov – *Niphargus*, *Troglocaris* ter *Asellus*, kakšne so možnosti za uporabo ČKD v praksi ter ali obstajajo posebnosti obravnavanih skupin, ki jih je treba pri takšnem delu upoštevati. Predlagamo tudi protokole za taksonomsko določanje na podlagi ČKD.

2. MATERIALI IN METODE

2.1 UPORABLJENA ZAPOREDJA DNA

2.1.1 Rod *Troglocaris*

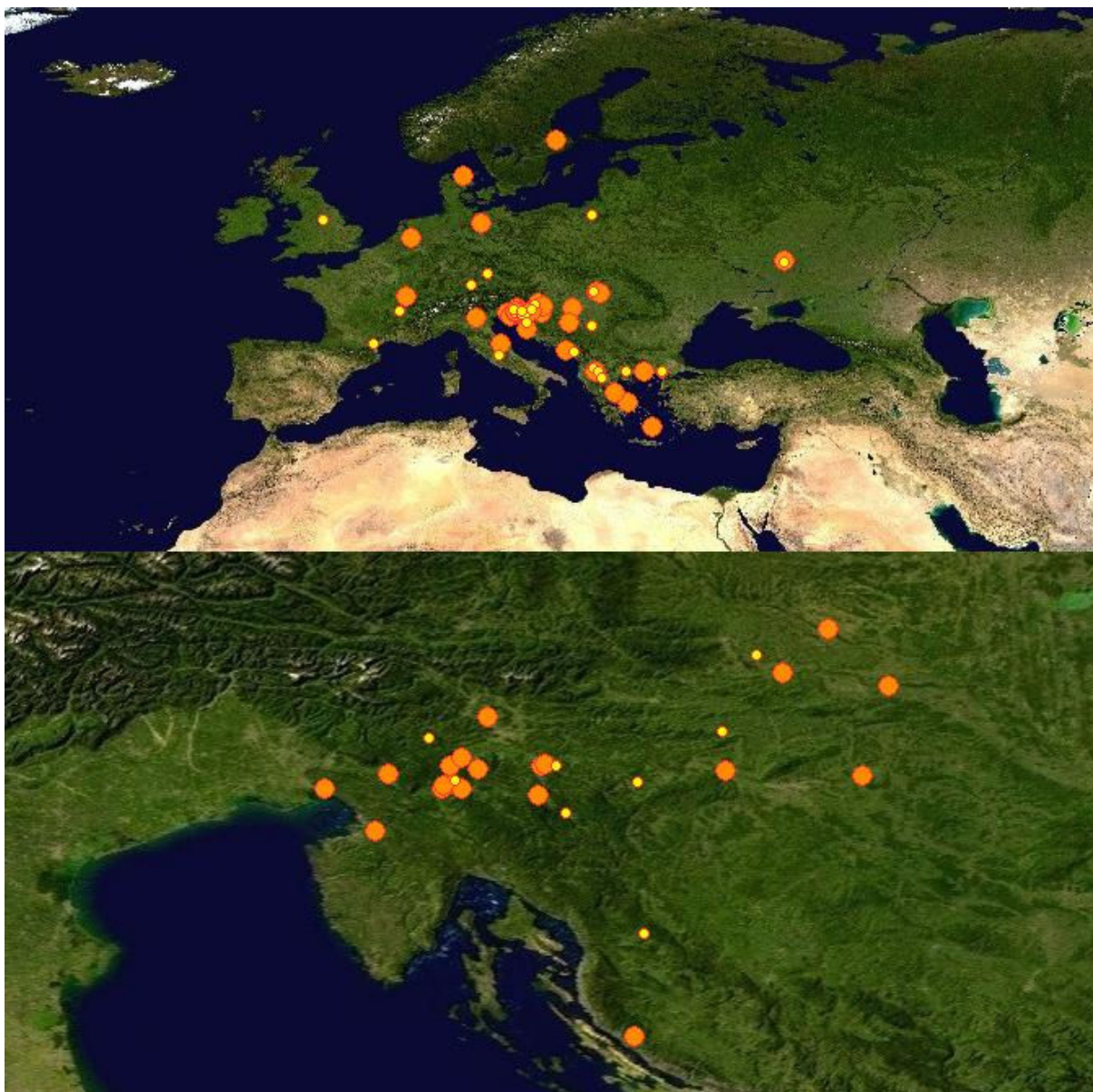
Taksonomija rodu v tej nalogi sledi taksonomiji v Sket in Zakšek, 2009; upoštevane so tam opisane vrste. Obenem smo kot ločene enote ekvivalentne vrstam upoštevali tudi vse klade iz Zakšek in sod. (2009), pri čemer je v tej nalogi zahodnoslovenski klad (»W-slo«) poimenovan *Troglocaris planinensis* v skladu s Sket in Zakšek (2009). Uporabili smo 73 zaporedij COI rodu *Troglocaris* iz dveh predhodnih raziskav (Zakšek in sod., 2007, 2009). Zastopane so bile vrste *T. planinensis* (9 zaporedij), *T. hercegovinensis* (3 zaporedja), *T. bosnica* (3 zaporedja), *T. pretneri* (2 zaporedji), *T. prasence* (2 zaporedji), neopisan takson *Troglocaris* sp. (1 zaporedje) ter kladi *T. anophthalmus* »E-slo« (8 zaporedij), »Adriatic« (12 zaporedij), »Istra« (1 zaporedje) in »Soča« (1 zaporedje). Eno od zaporedij klada »E-slo« je v Sket in Zakšek (2009) označeno kot *T. anophthalmus intermedia*, zato mu je dodana ta oznaka. Zaporedje vzorca iz Kršana, ki v Zakšek in sod. (2009) ni pripisan nobenemu kladu in se tudi prepričljivo ne združuje z nobeno od skupin, je označeno le kot *T. anophthalmus*. Poleg teh smo uporabili še 3 zaporedja COI vrste *Gallocaris inermis* (= *Troglocaris inermis*). Primerki *G. inermis* izvirajo iz jugovzhoda Francije, ostali vzorci so iz območja nekdanje Jugoslavije in severovzhoda Italije (slika 1). Zaporedja iz Zakšek in sod. (2007) so bila dolga 617 bp in so že bila vnešena tako v GenBank kot v BOLD, vendar imena še ne upoštevajo revidirane taksonomije (Sket in Zakšek, 2009), vnosom v BOLD pa so manjkali tudi vsi dodatni podatki, novejša zaporedja (Zakšek in sod., 2009) v BOLD še niso bila vnešena. Ta zaporedja so bila daljša, dolga do 1235 bp. Starejša zaporedja smo zaradi enostavnosti naložili iz baze BOLD, novejša pa iz GenBank. Iz celotnega nabora smo izločili zaporedja, ki niso predstavljala ločenih haplotipov (so bila identična drugemu zaporedju v celotnem območju prekrivanja), kar velja tako za starejša kot novejša zaporedja. Preglednica vseh uporabljenih zaporedij s pripadajočimi oznakami v GenBank in ter točnimi lokalitetami je v prilogi A.



Slika 1: Lokalitete vzorčenja rodov *Trogloniscus* in *Gallogoniscus*. Večji krožci predstavljajo lokalitete, s katerih je več kot pet uporabljenih zaporedij.

2.1.2 Rod *Asellus*

Pri rodu *Asellus* smo uporabili 211 zaporedij COI, pridobljenih v predhodnih raziskavah (Verovnik in sod., 2004; Verovnik in sod., 2005), od tega 198 zaporedij vrste *Asellus aquaticus*, 7 zaporedij vrste *Asellus kosswigi* ter 6 zaporedij ukrajinskega prestvanika rodu (*Asellus* sp.). Vzorci *A. aquaticus* izvirajo z različnih delov Evrope, medtem ko so vzroci *A. kosswigi* iz jame Labodnice (Grotta di Trebiciano) pri Trebčah v Italiji (sliki 2 in 3), vzorci *Asellus* sp. pa iz bližine Kharkiva v Ukrajini. Zaporedja so na voljo v GenBank in so bila tudi že vnešena v BOLD, vendar brez pripadajočih podatkov in pod imenom *A. aquaticus*. Poleg teh zaporedij smo uporabili še 4 zaporedja COI *A. aquaticus* iz neotipske lokalitete (Ulva, blizu Uppsale na Švedskem; za analize smo od teh uporabili le 1 zaporedje (FJ749276), ker ostala ne predstavljajo novih haplotipov) ter 1 zaporedje *A. kosswigi* iz izvira *San Giovanni al Timavo* v Italiji. Ta zaporedja so bila pridobljena v novejši raziskavi (Verovnik in sod., 2009). Tudi ta zaporedja so na voljo v GenBank, niso pa še bila vnešena v BOLD. Vsa zaporedja, ki so že bila vnešena, smo naložili iz baze BOLD, novejša zaporedja pa iz GenBank. Preglednica vseh uporabljenih zaporedij s pripadajočimi oznakami v GenBank in točnimi lokalitetami je v prilogi B. Zaporedja so bila dolga 653 bp.



Slika 2: Lokalitete vzorčenja rodu *Asellus*. Večji krožci predstavljajo lokalitete, s katerih je več kot pet uporabljenih zaporedij. Zgoraj so prikazane lokalitete vzorčenja v Evropi, spodaj pa, podrobneje, lokalitete vzorčenja v Sloveniji in okolici.

2.1.3 Rod *Niphargus*

Uprabili smo 59 zaporedij 28S rDNA 55 vrst rodu *Niphargus*, pridobljenih v prejšnjih raziskavah (Fišer in sod., 2008; Trontelj in sod., 2009), večinoma iz tipskih lokalitet. Vzorci so iz različnih delov Evrope, večinoma pa iz Slovenije in drugih držav nekdanje Jugoslavije. Seznam vrst, lokalitet in oznak v GenBank je v prilogi C. Tri vrste (*N. zagrebensis*, *N. hvarensis*, *N. arbiter*) so bile zastopane z dvema ali več različnimi zaporedji. Kot pri rodovih

Troglocaris in *Asellus* smo tudi tu uporabili le po eno zaporedje, če so bila ta enaka. Zaporedja smo naložili iz baze GenBank. Zaporedja so različno dolga, vsa pa daljša od 800 bp.

Tabela 1: Seznam obravnavanih taksonov

Troglocaris	št. zaporedij	Niphargus	št. zaporedij
<i>Troglocaris anophthalmus</i>	1	<i>Niphargus illidzensis</i>	1
<i>Troglocaris anophthalmus "Adriatic"</i>	12	<i>Niphargus karamani</i>	1
<i>Troglocaris anophthalmus "E-slo"</i>	24	<i>Niphargus kenki</i>	1
<i>Troglocaris anophthalmus "Istra"</i>	1	<i>Niphargus kochianus</i>	1
<i>Troglocaris anophthalmus "Soča"</i>	1	<i>Niphargus krameri</i>	1
<i>Troglocaris bosnica</i>	1	<i>Niphargus labacensis</i>	1
<i>Troglocaris hercegovinensis</i>	3	<i>Niphargus lessiniensis</i>	1
<i>Troglocaris planinensis</i>	23	<i>Niphargus longicaudatus</i>	1
<i>Troglocaris prasence</i>	3	<i>Niphargus longiflagellum</i>	1
<i>Troglocaris pretneri</i>	2	<i>Niphargus lourensis</i>	1
<i>Troglocaris sp.</i>	1	<i>Niphargus maximus</i>	1
		<i>Niphargus novomestanus</i>	1
<i>Gallocaris inermis</i>	3	<i>Niphargus orcinus</i>	1
		<i>Niphargus pachytelson</i>	1
		<i>Niphargus pasquinii</i>	1
Asellus		<i>Niphargus pectinicauda</i>	1
<i>Asellus aquaticus</i>	202	<i>Niphargus podpecanus</i>	1
<i>Asellus kosswigi</i>	8	<i>Niphargus polymorphus</i>	1
<i>Asellus sp.</i>	6	<i>Niphargus pupetta</i>	1
		<i>Niphargus puteanus</i>	1
		<i>Niphargus rejici</i>	1
Niphargus		<i>Niphargus salonitanus</i>	1
<i>Niphargus aberrans</i>	1	<i>Niphargus sanctinaumi</i>	1
<i>Niphargus aquilex</i>	1	<i>Niphargus scopicauda</i>	1
<i>Niphargus arbiter</i>	2	<i>Niphargus slovenicus</i>	1
<i>Niphargus balcanicus</i>	1	<i>Niphargus sphagnicolis</i>	1
<i>Niphargus boskovici</i>	1	<i>Niphargus spinulifemur</i>	1
<i>Niphargus carniolicus</i>	1	<i>Niphargus spoeckeri</i>	1
<i>Niphargus dalmatinus</i>	1	<i>Niphargus stenopus</i>	1
<i>Niphargus dimorphopus</i>	1	<i>Niphargus stygius</i>	1
<i>Niphargus dobati</i>	1	<i>Niphargus tatrensis</i>	1
<i>Niphargus dolichopus</i>	1	<i>Niphargus timavi</i>	1
<i>Niphargus elegans</i>	1	<i>Niphargus trullipes</i>	1
<i>Niphargus factor</i>	1	<i>Niphargus valvasori</i>	1
<i>Niphargus fongi</i>	1	<i>Niphargus vinodolensis</i>	1
<i>Niphargus grandii</i>	1	<i>Niphargus vjetrenicensis</i>	1
<i>Niphargus hadzii</i>	1	<i>Niphargus wolfi</i>	1
<i>Niphargus hrabei</i>	1	<i>Niphargus zagrebensis</i>	2
<i>Niphargus hvarensis</i>	3		

2.2 VNOSI V BOLD

Uporabljena zaporedja COI se v BOLD nahajajo v projektu *Genbank Crustacea Malac.* - *University of Ljubljana [GBCUL]*. Oznake primerkov (*specimen ID*) so enake oznakam v GenBank (*GenBank accession*). Zaporedja, ki so bila v BOLD že prisotna, so bila v projekt predstavljena na zahtevo, nova zaporedja pa dodana v projekt preko spletnega obrazca. Večina podatkov o zaporedjih rodu *Asellus* je bila zaradi obsega podatkov posredovana preko preglednice (*specimen data spreadsheet*). Preko takšne preglednice smo posredovali tudi vse spremembe taksonomije, ker je imena taksonov pri vnosu podatkov preko spletnega obrazca možno le izbrati. Ostale podatke smo vnesli posamično preko spletnih obrazcev.

Nekatera zaporedja COI rodu *Troglocaris* so bila že vnešena v BOLD. Dodali smo vsa zaporedja iz Zakšek in sod. (2009), ki so bila v članku poimenovana. V bazo smo vnesli podatke o lokalitetah s koordinatami GPS.

Pri zaporedjih COI rodu *Asellus*, ki so bila že vnešena v BOLD, smo vnesli podatke o vzorčenju – nabiralca, določevalca, lokaliteto s koordinatami GPS in datum vzorčenja. V bazo smo vnesli tudi štiri nova zaporedja vrste *A. aquaticus* iz tipske lokalitete in eno vrste *A. kosswigi* iz izvira Timave (glej zgoraj). Pri petih novih zaporedjih smo ob prej navedenih podatkih o vzorčenju v bazo vnesli tudi podatke o spolu in razvojni stopnji osebkov, kromatograme ter podatke o začetnih oligonukleotidih. Pripadajoče datoteke .ab1 (kromatograme) smo poslali v arhivu .zip skupaj z excelovo preglednico o pripadajočih podatkih, kot je opisano v protokolu na straneh BOLD (<http://www.barcodinglife.org/>).

Ker BOLD še ne dopušča uporabe 28S rDNA kot primarnega označevalca, zaporedij rodu *Niphargus* vanj nismo vnesli.

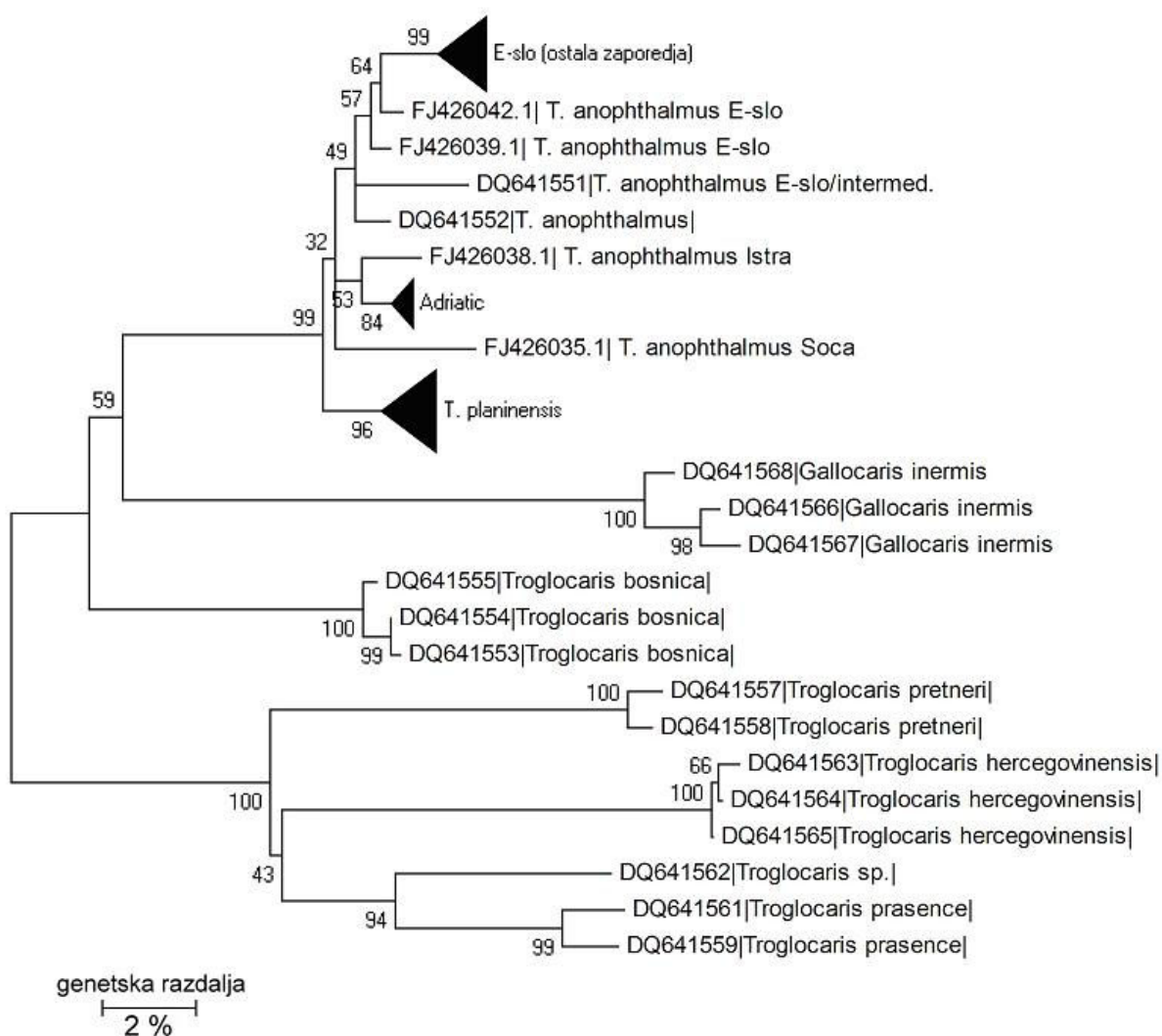
2.3 TESTIRANJE PRIMERNOSTI ZAPOREDIJ ZA DOLOČANJE VRST

Za uskladitev zaporedij smo uporabili algoritem ClustalW v programu MEGA 4.0 (Tamura in sod., 2007) s privzetimi parametri (teža odpiranja vrzeli 15, teža podaljševanja vrzeli 6,66). Uskladitve zaporedij COI so bile brez vrzeli, kar pa ne velja za 28S zaporedja. V programu MEGA 4.0 smo izračunali parne genetske razdalje znotraj vrst po Kimurinem dvoparametričnem modelu (K2P). Povprečne vrednosti in standardne napake (SE) smo izračunali naknadno v programu Microsoft Excel. V programu MEGA 4.0 smo po modelu K2P izračunali tudi povprečne genetske razdalje med vrstami. Pri rodu *Niphargus*, kjer smo analizirali 28S rDNA, smo vrzeli izločali paroma (pairwise deletion), pri zaporedjih COI pa insercij ali delecij, razen pri enem zaporedju *Asellus aquaticus* (DQ144763), ni bilo, in uporabili smo privzeto popolno izločanje (complete deletion). Za posamezne skupine rakov (rod *Asellus*, *Troglocaris* in *Niphargus*) smo poiskali filogenetska drevesa po metodi združevanja sosedov v programu MEGA 4.0. Za določanje genetskih distanc smo uporabili model K2P. Metoda združevanja sosedov je hiter pristop, ki je primeren za velike nabore podatkov (Hebert in sod., 2003a) in je pri delu s ČKD pogosto uporabljena. Statistično podporo filogenetskih dreves smo določili z metodo samovzorčenja (bootstrap) s 1000 ponovitvami.

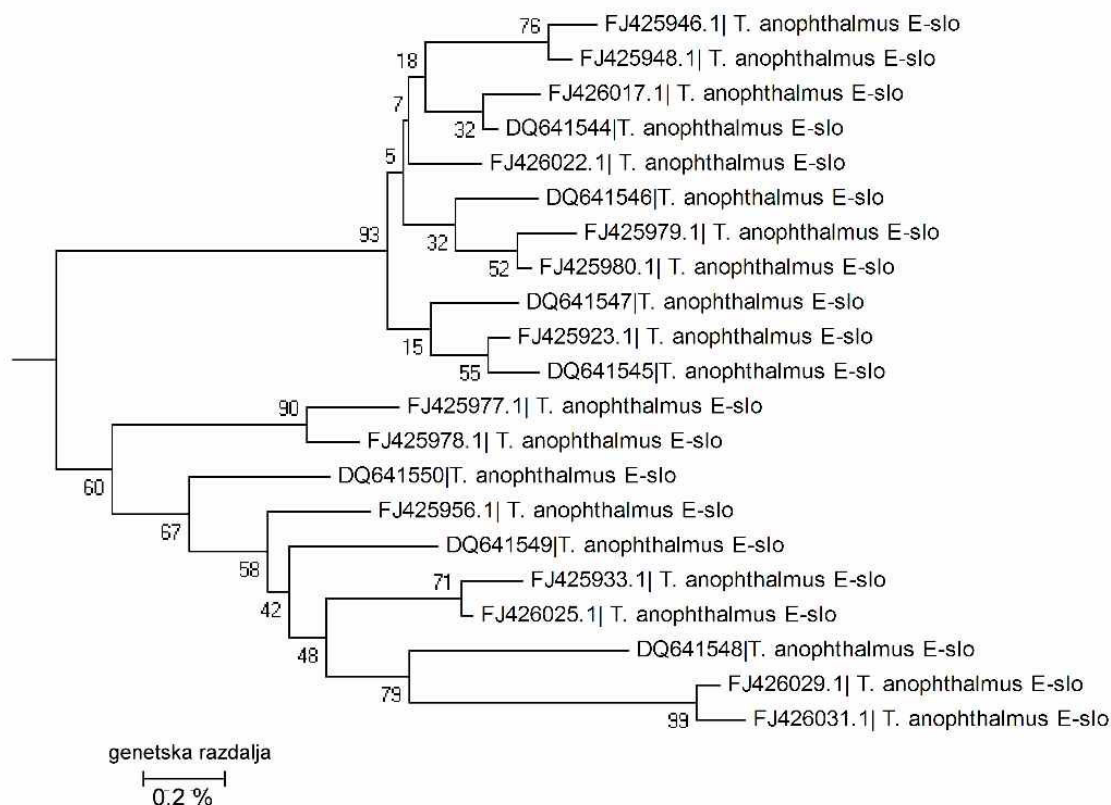
3. REZULTATI

3.1 ROD *Troglocaris*

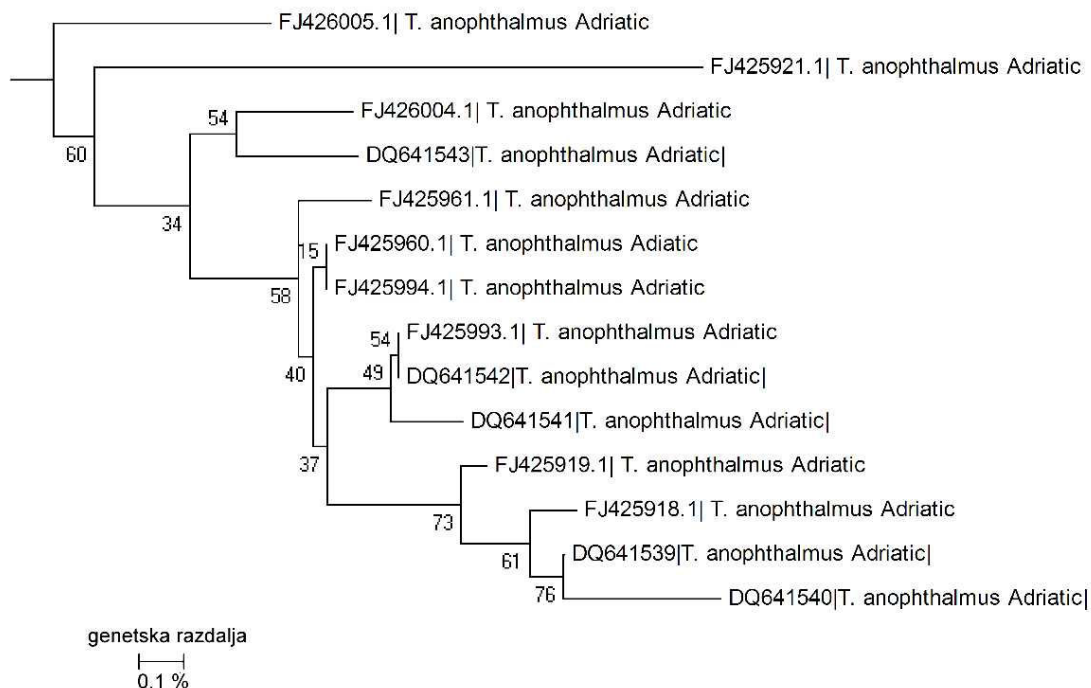
Z združevanjem sosedov pridobljeno drevo rodu *Troglocaris* kaže slika 5. Zaporedja se pri skupinah *Troglocaris bosnica*, *T. hercegovinensis*, *T. pretneri*, *T. prasence* ter *Gallocaris inermis* združujejo z močno statistično podporo (čez 99 %), skupina *T. planinensis* je nekoliko slabše podprta (96 %), z zelo šibko podporo pa se združujejo zaporedja *T. anophthalmus*. *T. anophthalmus* in *T. planinensis* se prepričljivo (z 99 % podporo) združujeta v sestrski odnos. Znotraj *T. anophthalmus* je skupina »Adriatic« zmerno podprta (82 %), vzhodnoslovenska skupina (»E-slo«) pa na račun treh zaporedij iz lokalitete Mikašiničeva Pečina (DQ621551, FJ426039, FJ426042) ni jasno oddeljena, pri čemer se s temi zaporedji (seveda z enako slabo podporo) združuje tudi zaporedje iz tunela Čepić (Kršan, Hrvaška; DQ641552), ki sicer ni pripisano nobeni skupini. Zelo dobro (99 %) je podprta skupina zaporedij znotraj klada »E-slo«, ki združuje zaporedja osebkov iz drugih lokalitet. Zaporedje skupine *T. anophthalmus* »Soča« se uvršča ločeno od ostalih skupin s precejšnjo genetsko razdaljo, zaporedje skupine »Istra« pa se s šibko podporo združuje s skupino »Adriatic«.



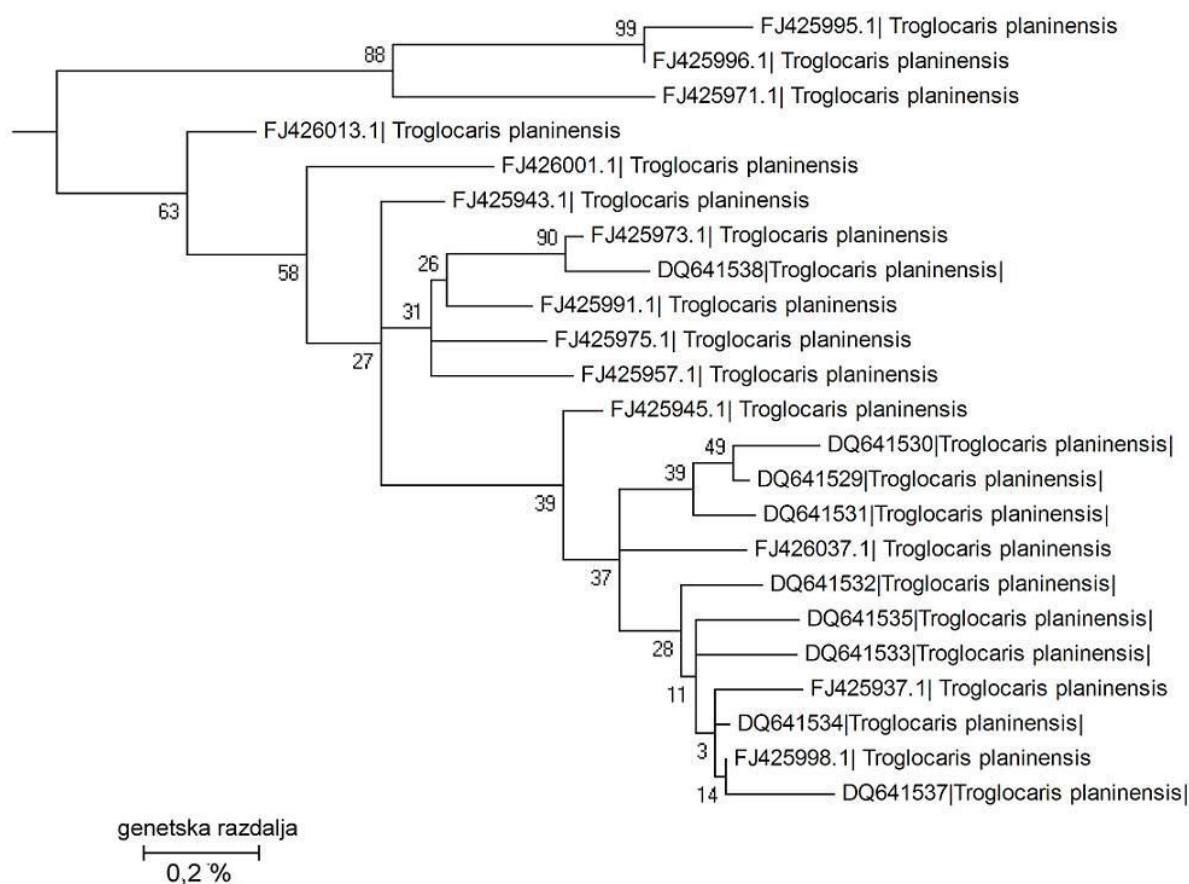
Slika 3: Drevo rodu *Troglolaris*, pridobljeno z metodo združevanja sosedov. Dolžine vej prikazujejo genetske razdalje po modelu K2P. Prikazana je statistična podpora razvejitev, pridobljena z metodo samovzorčenja s 1000 ponovitvami v odstotkih. Zaradi preglednosti podrobni odnosi v skupinah, zastopanih z več kot 10 predstavniki, niso prikazani.



Slika 4: Razširjeno razvejišče skupine »E-slo« - ostala zaporedja. Dolžine vej prikazujejo genetske razdalje po modelu K2P. Prikazana je statistična podpora razvejitev po metodi samovzorčenja s 1000 ponovitvami v odstotkih.



Slika 5: Razširjeno razvejišče skupine »Adriatic«. Dolžine vej prikazujejo genetske razdalje po modelu K2P. Prikazana je statistična podpora razvejitev po metodi samovzorčenja s 1000 ponovitvami v odstotkih.



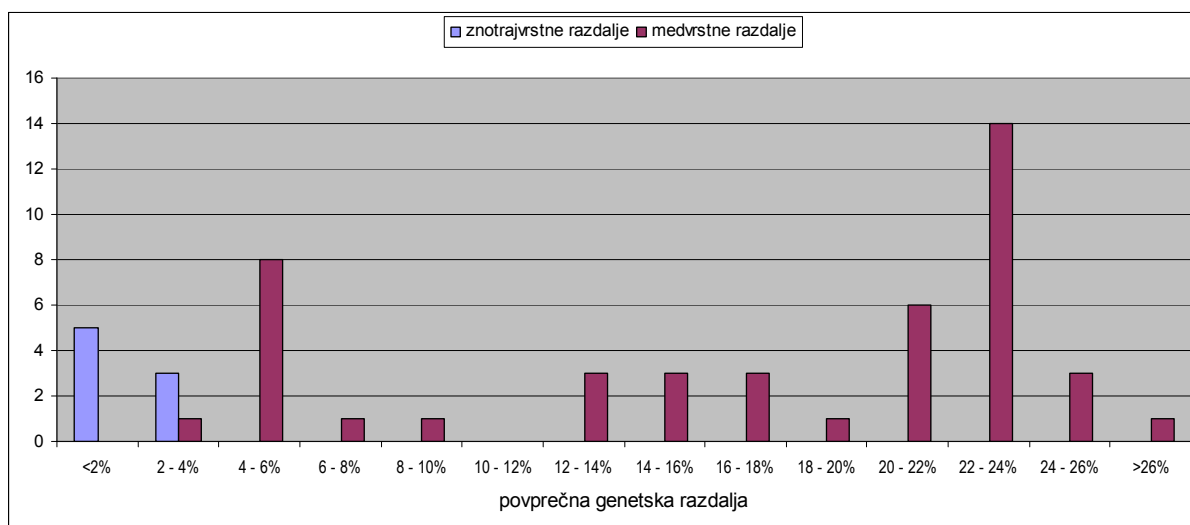
Slika 6: Razširjeno razvejišče vrste *T. planinensis*. Dolžine vej prikazujejo genetske razdalje po modelu K2P. Prikazana je statistična podpora razvejitvev po metodi samovzorčenja s 1000 ponovitvami v odstotkih.

Povprečne znotrajvrstne razdalje znotraj rodu *Trogllocaris* so prikazane v tabeli 2. Praviloma so manjše od 2 %, večje so pri skupini »E-slo« ter *T. prasence*, vendar je slednja vrsta zastopana le z dvema zaporedjema. Približno 2 % znaša tudi povprečna razdalja med zaporedji *Gallocaris inermis*. Sicer je povprečna znotrajvrstna razdalja večja od 1 % le še pri *T. pretneri*. Pri skupinah, zastopanih s po enim zaporedjem, znotrajvrstne raznolikosti ni bilo mogoče opredeliti.

Medvrstne razdalje znotraj rodu *Trogllocaris* v povprečju znašajo 16,8 %. Najmanjša je razdalja med zaporedjem skupine »Istra« ter zaporedji skupine »Adriatic« (2,8 %), sicer so razdalje med vrstami v povprečju večje od 4 %. Če obravnavamo klade znotraj *T. anophthalmus* ločeno, znašajo razdalje med njimi v povprečju 4,8 % in pri nobenem paru skupin niso manjše od 2 %.

Tabela 2: Povprečne znotrajvrstne razdalje rodu *Troglocaris* po modelu K2P.

	povprečna razdalja	SE
<i>G. inermis</i>	2.04%	0.45%
<i>T. bosnica</i>	0.71%	0.45%
<i>T. hercegovinensis</i>	0.47%	0.19%
<i>T. pretneri</i>	1.33%	/
<i>T. prasence</i>	2.51%	/
<i>T. planinensis</i>	0.95%	0.04%
<i>T. a.</i> "E-slo"	2.08%	0.07%
<i>T. a.</i> "Adriatic"	0.95%	0.07%

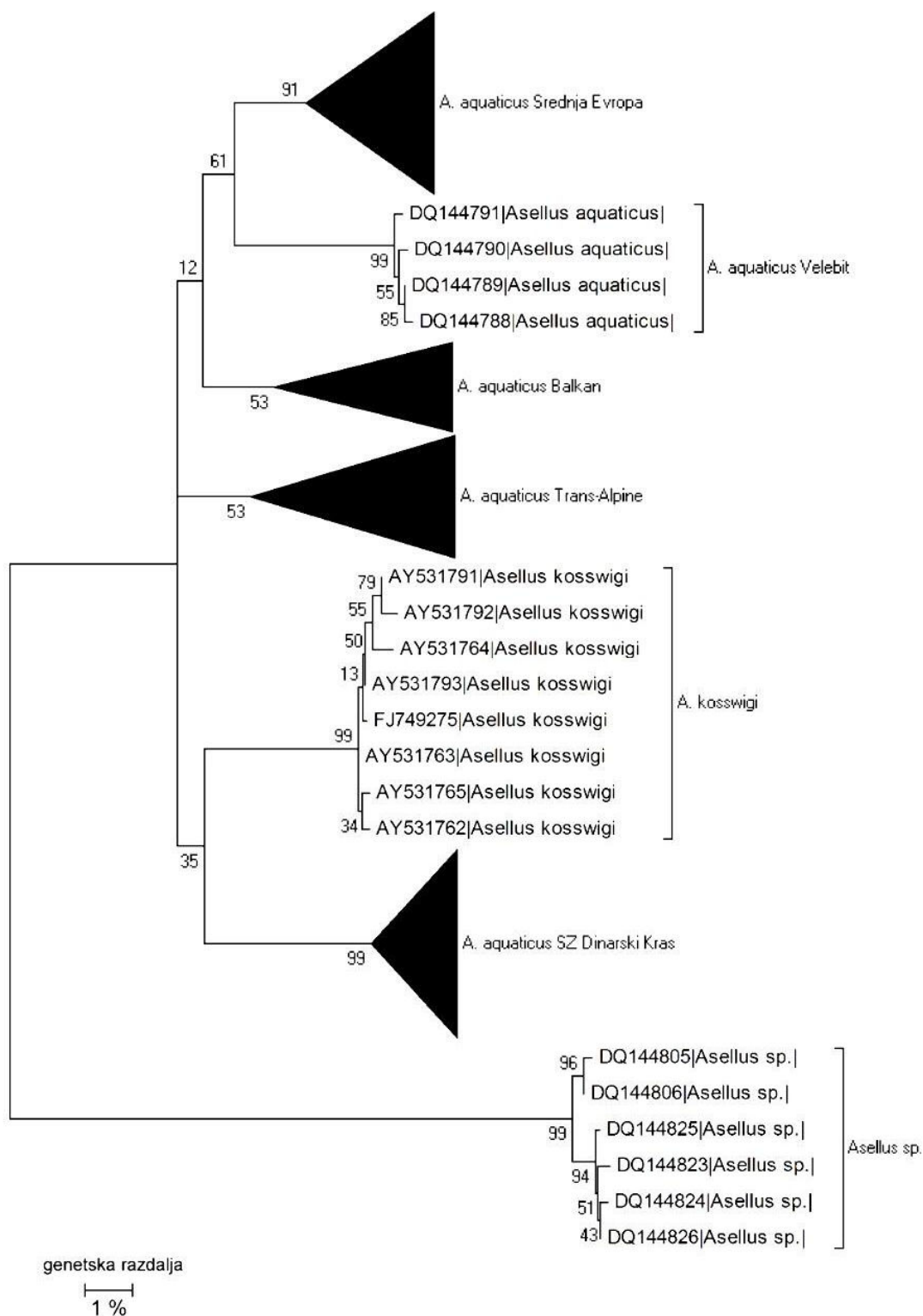


Slika 7: Primerjava znotrajvrstne in medvrstne variabilnosti rodu *Troglocaris*. Višina stolpcev predstavlja št. taksonov (znotrajvrstna variabilnost) ali št. parov taksonov (medvrstna variabilnost), katerih povprečna genetska razdalja spada v dan interval.

3.2 ROD *Asellus*

Po metodi združevanja sosedov se zaporedja COI vrst *Asellus kosswigi* ter *Asellus* sp. združujejo skupaj z močno podporo (slika 10). Zaporedja COI parafiletskega (Verovnik in sod., 2005) *A. aquaticus* oblikujejo šest skupin, od katerih pa so le tri sprejemljivo podprte po metodi samovzorčenja – te ustrezajo geografskim skupinam Severozahodnega Dinarskega krasa, Velebita in Srednje Evrope (»NW Dinaric Karst«, »Velebit«, »Central Europe«) v Verovnik in sod. (2005). Primerki iz neotipske lokalitete *A. aquaticus* (Ulva na Švedskem) pripadajo skupini Srednje Evrope. Drugi, slabo podprti skupini združujeta zaporedja čezalpske ter balkanske skupine (»Trans-Alpine«, »Balkan«; Verovnik in sod., 2005), čeprav z drugačno uvrstitvijo nekaterih bazalnih zaporedij. Znotraj posameznih skupin se zaporedja

večinoma združujejo v šibko podprte podskupine in skupke zaporedij iz iste ali bližnjih lokalitet.

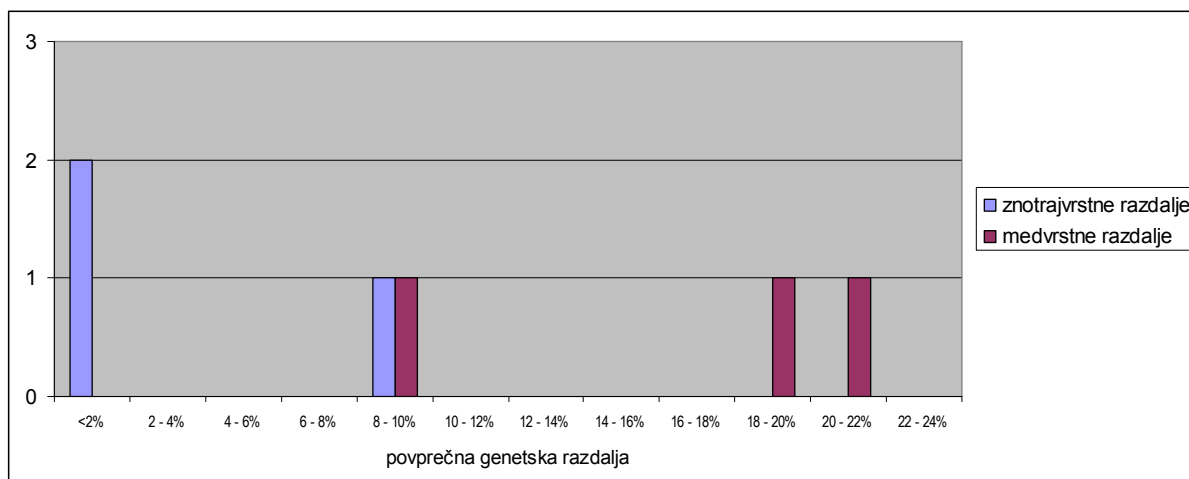


Slika 8: Drevo rodu *Asellus*, pridobljeno z metodo združevanja sosedov. Dolžine vej predstavljajo razdalje po modelu K2P. Prikazana je statistična podpora razvejitev po metodi samovzorčenja s 1000 ponovitvami v odstotkih. Zaradi preglednosti podrobni odnosi v skupinah z več kot 10 predstavnikov niso prikazani.

Povprečen genetske razdalje znotraj vrst kaže tabela 4. Povprečna genetska razdalja znotraj vrste *A. aquaticus* znaša 9,2 %, medtem ko je povprečna razdalja znotraj *A. kosswigi* precej manjša, okoli 0,6 %, podobna je tudi povprečna genetska razdalja znotraj *Asellus* sp. (0,7 %). Maksimalna znotrajvrstna genetska razdalja pri *A. aquaticus* znaša 16 %, pri *A. kosswigi* in *Asellus* sp. le 1 %. Povprečna razdalja med *A. aquaticus* in *A. kosswigi* je 9,3 %, torej je primerljiva s povprečno znotrajvrstno razdaljo pri *A. aquaticus*. Povprečna razdalja med *Asellus* sp. in obema drugima vrstama je okoli 20 %.

Tabela 3: Povprečne znotrajvrstne genetske razdalje pri rodu *Asellus* po modelu K2P.

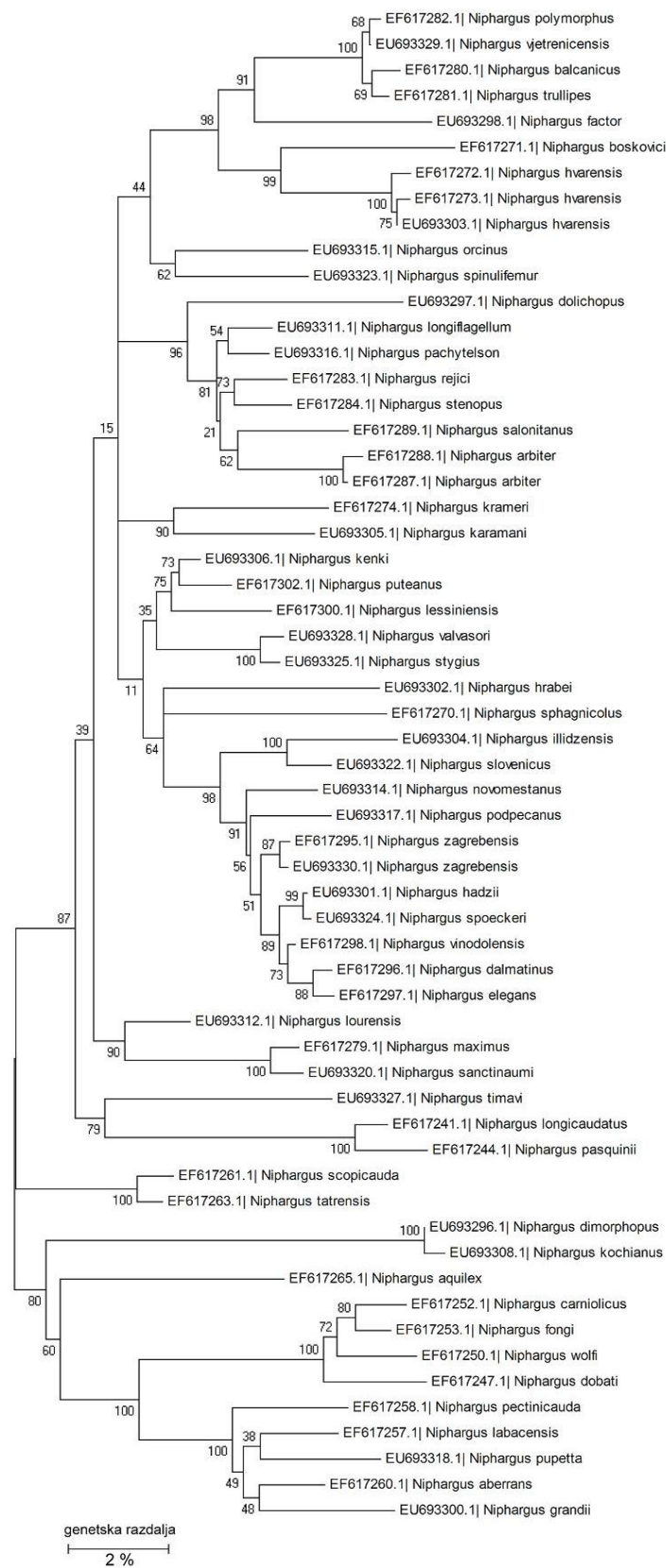
	povprečna razdalja	SE
<i>Asellus aquaticus</i>	9.21%	0.05%
<i>Asellus kosswigi</i>	0.56%	0.03%
<i>Asellus</i> sp.	0.67%	0.10%



Slika 9: Primerjava znotrajvrstne in medvrstne variabilnosti rodu *Asellus*. Višina stolpcev predstavlja št. taksonov (znotrajvrstna variabilnost) ali št. parov taksonov (medvrstna variabilnost), katerih povprečna genetska razdalja spada v dan interval.

3.3 ROD *Niphargus*

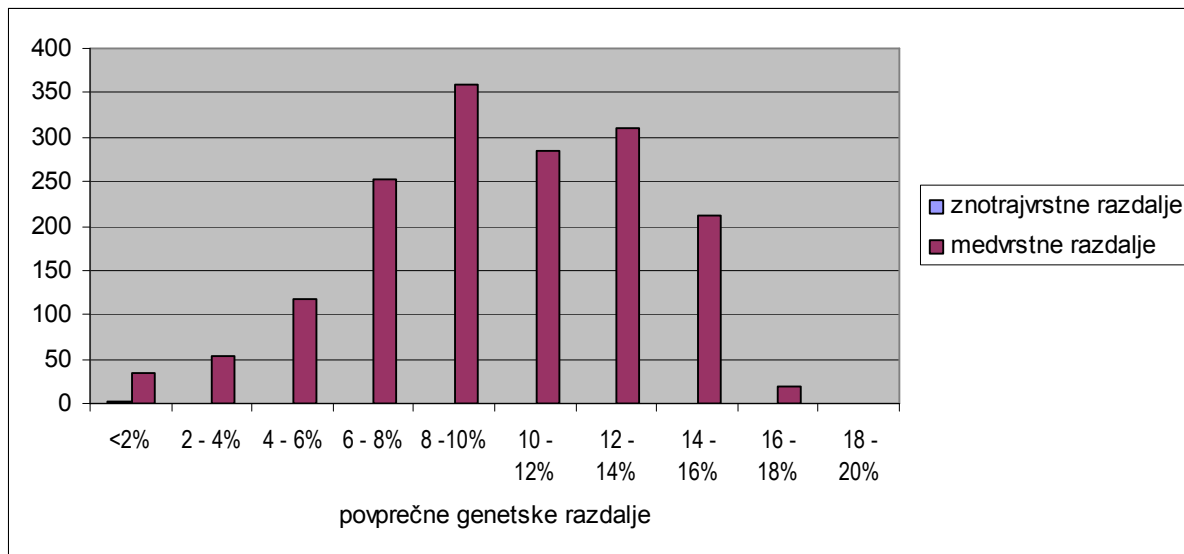
Pri vrstah rodu *Niphargus*, ki so zastopane z vsaj dvema različnima zaporedjema 28S rDNA, se zaporedja pri združevanju sosedov združujejo skupaj s prepričljivo podporo, in sicer 100 % (*N. arbiter*, *N. hvarensis*) ali 87 % (*N. zagrebensis*; slika 10). Izračunane povprečne znotrajvrstne genetske razdalje (tabela 5) znašajo 0,36 % (*N. zagrebensis*) ter 0,48 % (*N. arbiter*, *N. hvarensis*), v povprečju 0,44 %, medtem ko je povprečna medvrstna razdalja 10 %. Razdalje med pari vrst, ki se združujejo skupaj, so v nekaterih primerih primerljive z ugotovljenimi povprečnimi znotrajvrstnimi razdaljami – v parih *N. dimorphopus*-*N. kochianus*, *N. spoeckeri*-*N. hadzii* ter *N. polymorphus*-*N. vjetrenicensis* znašajo le 0,24 %. Razporeditev medvrstnih in znotrajvrstnih genetskih razdalj kažeta sliki 11 in 12. Večina medvrstnih razdalj je za velikostni razred večjih od znotrajvrstnih, ki nikoli niso presegle 0,5 %.



Slika 10: Drevo rodu *Niphargus*, pridobljeno z metodo združevanja sosedov. Dolžine vej prikazujejo genetske razdalje po modelu K2P. Prikazana je statistična podpora razvejišč po metodi samovzorčenja s 1000 ponovitvami v odstotkih.

Tabela 4: Povprečne znotrajvrstne genetske razdalje pri rodu *Niphargus* po modelu K2P.

	povprečna razdalja	SE
<i>N. zagrebensis</i>	0,36 %	0,14 %
<i>N. arbiter</i>	0,48 %	/
<i>N. hvarensis</i>	0,48 %	/



Slika 11: Primerjava znotrajvrstne in medvrstne variabilnosti rodu *Niphargus*. Višina stolpcev predstavlja št. taksonov (znotrajvrstna variabilnost) ali št. parov taksonov (medvrstna variabilnost), katerih povprečna genetska razdalja spada v dan interval.

3.4 PREDLAGANE METODE TAKSONOMSKEGA DOLOČANJA

V tem delu predlagamo postopek določitve taksonomske pripadnosti vzorca na podlagi zaporedja DNA. Če so na voljo registrirane ČKD, je določanje natančno z uporabo spletišča BOLD z identifikacijskim orodjem (*identification engine*). Pri takem določanju v temu namenjeno polje vnesemo zaporedje v formatu FASTA, izberemo bazo, po kateri poteka iskanje (na voljo so baza registriranih ČKD, baza vseh do vrste natančno poimenovanih vnosov ter baza vseh vnosov) in zaženemo iskalnik. Ko je najdeno najpodobnejše zaporedje, lahko izberemo tudi možnost identifikacije na podlagi drevesa (*tree based identification*), ki vrne drevo po metodi združevanja sosedov, v katerega je umeščeno naše zaporedje. Tukaj predlagamo alternativo s samostojno bazo zaporedij in programom MEGA 4.0. Ta pristop k določanju ne vključuje spleta.

3.4.1 Pomnoževanje

Predlagamo pomnoževanje zaporedij COI in 28S rDNA kot je opisano v Zakšek in sod. (2007). Postopek je podrobneje naveden v prilogi D.

3.4.2 Sekvenciranje

Uporabi se lahko kakršnakoli metoda; če je rezultat datoteka .ab1, jo je možno uporabiti neposredno za določanje z uporabo programa MEGA.

3.4.3 Določanje vrst

V programu MEGA odpremo uskladitev referenčne baze zaporedij za rod, ki nas zanima. Nova zaporedja (bodisi kot datoteke .ab1 bodisi kot datoteke FASTA) dodamo k uskladitvi in jih uskladimo z referenčno bazo s algoritmom ClustalW (predlagamo privzete nastavitve uteži za odpiranje (15) in podaljševanje vrzeli (6,66)). Uskladitev shranimo kot datoteko .meg in odpremo. Izberemo *Phylogeny -> Construct Phylogeny -> Neighbor Joining*. Odpre se pogovorno okno, ki nas sprašuje o nastavitvah. Te ostanejo privzete razen modela – možnost *Model* spremenimo v (*Nucleotide -> Kimura 2-Parameter*). Pri rodu *Niphargus* je za zadostno informativnost zaporedij potrebno izbrati *Gaps/Missing Data -> Pairwise deletion*. Če

želimo, lahko program opravi tudi test podprtosti, vendar to praviloma ni potrebno. Vrstna pripadnost neznanih zaporedij je enaka pripadnosti zaporedij, s katerimi se združujejo.

3.4.4 Referenčna zaporedja

Ustvarjanje referenčne baze zahteva nekoliko več dela, vendar je potrebno le enkrat. Pri rodovih *Troglocaris* in *Asellus* se referenčna zaporedja najenostavneje naložijo iz baze BOLD, kjer se nahajajo v projektu *Genbank Crustacea Malac. – University of Ljubljana [GBCUL]*. Potrebna zaporedja za posamezen rod označimo in jih naložimo kot eno samo datoteko FASTA s povezavo (*Downloads*) *sequences*. Ker so oznake, ki jih ustvari BOLD predolge, je dobro zaporedja preimenovati v skladu z imeni v seznamu. Pri rodu *Niphargus* je zaporedja treba naložiti iz GenBank s povezavo (*Download*) *FASTA*. Tudi ta zaporedja je pred poravnavo dobro preimenovati.

Referenčno uskladitev dobimo tako, da vsa referenčna zaporedja rodu odpremo v MEGA, jih uskladimo, kot je opisano zgoraj in uskladitev shranimo kot datoteko .mas. Sezname oznak GenBank (enako so vzorci označeni v BOLD) so v tabelah 5-7.

Tabela 5: Seznam referenčnih zaporedij za rod *Troglocaris*. V levem stolpcu so oznake zaporedij v GenBank.

DQ641561	<i>Troglocaris prasence</i>
DQ641559	<i>Troglocaris prasence</i>
DQ641562	<i>Troglocaris</i> sp.*
DQ641563	<i>Troglocaris hercegovinensis</i>
DQ641565	<i>Troglocaris hercegovinensis</i>
DQ641557	<i>Troglocaris pretneri</i>
DQ641558	<i>Troglocaris pretneri</i>
DQ641553	<i>Troglocaris bosnica</i>
DQ641555	<i>Troglocaris bosnica</i>
FJ425971	<i>Troglocaris planinensis</i>
DQ641537	<i>Troglocaris planinensis</i>
DQ641552	<i>Troglocaris anophthalmus</i>
DQ641551	<i>Troglocaris a. anophthalmus</i> »E-slo« (<i>intermedia</i>)
DQ641547	<i>Troglocaris anophthalmus</i> »E-slo«
FJ426005	<i>Troglocaris a.</i> »Adriatic«
DQ641541	<i>Troglocaris a.</i> »Adriatic«
FJ426038	<i>Troglocaris a.</i> »Istra«
FJ426035	<i>Troglocaris a.</i> »Soča«
	* neopisan takson v Sket in Zakšek, 2009

Tabela 6: Seznam referenčnih zaporedij za rod *Asellus*. V levem stolpcu so oznake zaporedij v GenBank.

AY531798	<i>Asellus aquaticus</i>	SZ Dinarski Kras
FJ749278	<i>Asellus aquaticus</i>	tipski
DQ144756	<i>Asellus aquaticus</i>	»Trans-Alpine«
AY531793	<i>Asellus kosswigi</i>	
AY531762	<i>Asellus kosswigi</i>	
DQ144823	<i>Asellus</i> sp.	

Tabela 7: Seznam referenčnih zaporedij za rod *Niphargus*. V levem stolpcu so oznake zaporedij v GenBank.

EF617260	<i>Niphargus aberrans</i>
EF617265	<i>Niphargus aquilex</i>
EF617287	<i>Niphargus arbiter</i>
EF617287	<i>Niphargus arbiter</i>
EF617280	<i>Niphargus balcanicus</i>
EF617271	<i>Niphargus boskovici</i>
EF617252	<i>Niphargus carniolicus</i>
EF617296	<i>Niphargus dalmatinus</i>
EU693296	<i>Niphargus dimorphopus</i>
EF617247	<i>Niphargus dohati</i>
EU693297	<i>Niphargus dolichopus</i>
EF617297	<i>Niphargus elegans</i>
EU693298	<i>Niphargus factor</i>
	(se nadaljuje)

(nadaljevanje)	
EF617253	<i>Niphargus fongi</i>
EU693300	<i>Niphargus grandii</i>
EU693301	<i>Niphargus hadzii</i>
EU693302	<i>Niphargus hrabei</i>
EF617272	<i>Niphargus hvarensis</i>
EF617273	<i>Niphargus hvarensis</i>
EU693304	<i>Niphargus illidzensis</i>
EU693305	<i>Niphargus karamani</i>
EU693306	<i>Niphargus kenki</i>
EU693308	<i>Niphargus kochianus</i>
EF617274	<i>Niphargus krameri</i>
EF617257	<i>Niphargus labacensis</i>
EF617300	<i>Niphargus lessiniensis</i>
EF617241	<i>Niphargus longicaudatus</i>
EU693311	<i>Niphargus longiflagellum</i>
EU693312	<i>Niphargus lourensis</i>
EF617279	<i>Niphargus maximus</i>
EU693314	<i>Niphargus novomestanus</i>
EU693315	<i>Niphargus orcinus</i>
EU693316	<i>Niphargus pachytelson</i>
EF617244	<i>Niphargus pasquinii</i>
EF617258	<i>Niphargus pectinicauda</i>
EU693317	<i>Niphargus podpecanus</i>
EF617282	<i>Niphargus polymorphus</i>
EU693318	<i>Niphargus pupetta</i>
EF617302	<i>Niphargus puteanus</i>
EF617283	<i>Niphargus rejici</i>
EF617289	<i>Niphargus salonitanus</i>
EU693320	<i>Niphargus sanctinaumi</i>
EF617261	<i>Niphargus scopicauda</i>
EU693322	<i>Niphargus slovenicus</i>
EF617270	<i>Niphargus sphagnicolis</i>
EU693323	<i>Niphargus spinulifemur</i>
EU693324	<i>Niphargus spoeckeri</i>
EF617284	<i>Niphargus stenopus</i>
EU693325	<i>Niphargus stygius</i>
EF617263	<i>Niphargus tatrensis</i>
EU693327	<i>Niphargus timavi</i>
EF617281	<i>Niphargus trullipes</i>
EU693328	<i>Niphargus valvasori</i>
EF617298	<i>Niphargus vinodolensis</i>
EU693329	<i>Niphargus vjetrenicensis</i>
EF617250	<i>Niphargus wolfi</i>
EU693330	<i>Niphargus zagrebensis</i>
EF617295	<i>Niphargus zagrebensis</i>

4. RAZPRAVA IN ZAKLJUČKI

4.1 RAZPRAVA

4.1.1 Primernost določanja na podlagi kratkih zaporedij DNA

Pri rodu *Troglocaris* se z združevanjem sosedov zaporedja vseh vrst v smislu tu obravnavane taksonomije (po Sket in Zakšek, 2009) združujejo skupaj in ločeno od drugih skupin z dobro podprtostjo. Glede kladov znotraj *Troglocaris anophthalmus* (Zakšek in sod., 2009) pa je situacija nekoliko bolj zapletena, ker so zaporedja COI posameznih kladov manj jasno diferencirana. Skupina »Adriatic« je precej dobro ločena tako glede podprtosti kot genetske razdalje od drugih skupin, pri čemer ji je precej blizu skupina »Istra«, o kateri pa je težko kaj z gotovostjo zaključiti (Zakšek in sod., 2009). Skupina »E-slo« je sicer zelo dobro ločena, vendar odstopa nekaj bazalnih zaporedij; eden od teh osebkov je bil sicer oddeljen kot podvrsta *T. anophthalmus intermedia* (Sket in Zakšek, 2009). Problematično je tudi zaporedje iz tunela Čepić (*T. anophthalmus*), ki se ne loči jasno od skupine »E-slo«. Zanimiv je položaj zaporedij *Gallocaris inermis*, drugega rodu, ker se uvrščajo sestrsko skupini, ki jo tvorita *T. anophthalmus* in *T. planinensis*. Takšna uvrstitev seveda za namene določanja ni relevantna, saj globlji odnosi med posameznimi vrstami niso tako pomembni kot pravilno združevanje zaporedij istih vrst (Hebert in Gregory, 2005). Znotraj taksonov so genetske razdalje neobičajno visoke le pri *T. prasence* (razdalja med obema zaporedjema je 2,5 %); če upoštevamo, da je povprečna razdalja med obravnavanimi taksoni skoraj 17 %, najbližji sosed (*Troglocaris* sp.) pa je od *T. prasence* oddaljen več kot 9 %, to za določanje ni problematično.

Diverziteta rodu *Troglocaris* je sicer večja, kot je zaobjeta v tej nalogi, vendar je bilo vzorčenje nekaterih taksonov zelo obsežno in verjetno je, da je variabilnost znotraj taksonov dobro opredeljena. Slovenske populacije rodu so dovolj jasno diferencirane, da so določljive brez težav, če to velja za vse klade znotraj trenutnega *T. anophthalmus*, pa je težko zaključiti. Problematičen je zlasti klad »E-slo«, ki je zelo variabilen, razdalje do sosedov pa so razmeroma nizke; vendar tudi tu ni nujno, da je nedoločljiv zgolj s COI, saj se ob obstoječem naboru podatkov najverjetneje lahko zanesljivo uvrsti tudi nova zaporedja. Bližnji kladi so temeljito pokriti in zato ni verjetno, da bi se neznano zaporedje uvrstilo napačno, v kolikor je v referenčno bazo vključenih dovolj zaporedij skupine »E-slo«, da je njena celotna COI

variabilnost dobro zastopana – upoštevana pa morajo biti tudi problematična zaporedja. V tem primeru bi bilo za določanje boljše uporabiti združevanje sosedov, ker je iz drevesa boljše razvidno, kam se uvršča neznan zaporedje.

Rod *Asellus* je bil zastopan sicer le s tremi vrstami, vendar z zelo obsežnim vzorcem zaporedij, zato lahko predpostavimo, da je variabilnost vrst zelo dobro opredeljena. *A. kosswigi* se dobro loči, genetske razdalje znotraj vrste pa so bistveno nižje od razdalj do najbližjega soseda vrste *A. aquaticus*, zato težav pri določanju te vrste ni pričakovati. Tudi *Asellus* sp. se dobro loči. Bolj pester je *A. aquaticus*, pri katerem se zaporedja COI združujejo v več skupin, od katerih so nekatere tudi zelo dobro podprte z metodo samovzorčenja. Težava se, ker je *A. aquaticus* parafiletski, lahko pojavi v primerih, ko so nekatera zaporedja, zlasti iz skupine SZ Dinarskega krasa, podobnejša zaporedjem *A. kosswigi* kot drugim zaporedjem lastne vrste. Za zanesljivo določanje je tudi tu potrebna referenčna baza, ki dobro predstavlja celotno variabilnost *A. aquaticus*. Večina skupin znotraj *A. aquaticus* ni podprtih z drugimi podatki. Na podlagi 28S rDNA se loči le skupina SZ Dinarskega krasa (Verovnik in sod., 2005) in verjetno tu nimamo opravka s prikrito diverzitetjo. Veliko variabilnost zaporedij COI pri tej vrsti se mogoče lahko izkoristi, ker do neke mere omogoča pripis neznanega vzorca širši geografski skupini, ko so referenčna zaporedja ustrezno poimenovana. Podobno stanje, kjer je ena od vrst parafiletska, teoretično obravnavajo Will in sod. (2005). Na podlagi ČKD naj bi bilo v takem primeru nemogoče določiti vzorec, katerega označevalno zaporedje DNA se uvršča med zaporedja obeh vrst v referenčni bazi. Teoretično stanje, ki ga predvidevajo Will in sod., je dejansko problematično le, če obstaja med označevanimi zaporedji obeh vrst zvezen prehod in torej vrsti na podlagi izbranega genetskega označevalca nista zaznavni. Če sta vrsti genetsko ločeni, je napačna uvrstitev novega vzorca le posledica pomanjkljivega vzorčenja in vrsti sta določljivi, če referenčni nabor nukleotidnih zaporedij dobro predstavlja njuno variabilnost. V tem primeru se bo novo označevalsko zaporedje uvrstilo najbližje zaporedjem svoje vrste (Meyer in Paulay, 2005).

Rod *Niphargus* je bil sicer zastopan z največ vrstami, le tri od teh pa z več različnimi zaporedji 28S rDNA, zato je znotrajvrstno raznolikost težko ovrednotiti. Gledano v celoti rezultati kar dobro ustrezajo rezultatom podobnih raziskav pri nevretenčarjih na podlagi COI (npr. Cywinska in sod., 2006). Pri treh vrstah z več različnimi zaporedji so znotrajvrstne genetske razdalje razmeroma nizke. Genetske razdalje med vrstami so različne – lahko so

precej večje od znotrajvrstnih (povprečno znašajo okoli 10 %, kar je mnogo več od znotrajvrstnih razdalj), v nekaterih primerih pa so zelo nizke (npr. pri parih *N. spoeckeri* – *N. hadzii*, *N. vjetrenicensis* – *N. polymorphus* in *N. dimorphopus* – *N. kochianus*). Pri takšnih parih vrst je lahko določanje do vrstnega nivoja preko ČKD neuspešno, vendar to ni nujno, če je tudi znotrajvrstna variabilnost 28S rDNA pri takšnih skupinah vrst zelo nizka, kar pa velja še preveriti. 28S rDNA je označevalec, ki so ga do sedaj pri rodu *Niphargus* najbolj konsistentno pomnožili s PCR (Lefébure in sod., 2007; Fišer in sod., 2008), kar govori v prid njegovi uporabi za določanje vrst.

Kljub temu, da je bilo pri rodu *Niphargus* obravnavanih največ vrst, je bila taksonomska pokritost rodu v tej nalogi razmeroma nizka, ker je izredno pester – zlasti če upoštevamo še neopisano prikrito diverzitetu. Glede na rezultate v tej nalogi in predhodne ugotovitve (Lefébure in sod., 2007; Fišer in sod., 2008), pa je verjetno, da je določanje večine vrst rodu na podlagi 28S rDNA pri tej skupini možno, tudi če je nekaj vrst problematičnih.

Pri obravnavanih skupinah živali ni nobenega primera, kjer bi dva ali več taksonov delilo enaka zaporedja COI ali 28S rDNA, torej so na podlagi teh zaporedij določljivi vsi taksoni. Pri rodovih *Troglocaris* in *Niphargus* so nekateri kladi šibko diferencirani, medtem ko smo pri rodu *Asellus* pričala zelo veliki variabilnosti znotraj vrste, kar morda zahteva prilagojen pristop k uporabi ČKD pri teh skupinah. Pri nobeni od obravnavanih skupin, še posebej pri rodu *Niphargus*, taksonomija tudi še ni povsem dorečena, kar otežuje rutinsko uporabo ČKD že na tej stopnji.

4.1.2 Metode taksonomskega določanja

Glede na primernost COI za določanje vrst rodov *Asellus* in *Troglocaris* je za ta namen ustrezna uporaba baze BOLD. Baza omogoča pripis novega zaporedja vrsti, če od že znanih le nekoliko odstopa ali umestitev v drevo preko združevanja sosedov. Registriranih ČKD trenutno ni za nobenega od tu obravnavanih rodov, čeprav je določanje z BOLD vsaj pri rodu *Asellus* trenutno natančno, če se išče širše (lahko se išče po celotni bazi, ne le med registriranimi ČKD z možnostjo *Species Level Barcode Records* namesto privzete *Registered Barcodes*). Natančno pa ni določanje pri rodu *Troglocaris*, ker so v bazi prisotna tudi drugače določena zaporedja drugih avtorjev, nekateri kladi pa niso oddeljeni kot vrste. Pri vseh

taksonih bi bilo za trajno zanesljivo določanje seveda treba pridobiti registrirane ČKD, za to pa so potrebna veljavna vrstna imena, kromatogrami sekvenciranja ter shranjeni izvorni vzorci. BOLD je trenutno neprimeren za rod *Niphargus*, kjer je COI težavno pomnoževati, čeprav je možno, da bo baza v prihodnje sprejemala 28S rDNA kot enega primarnih označevalcev. Pri tem rodu bi bilo to vsekakor koristno.

Iz teh razlogov za takojšnje določanje predlagamo pristop s sestavo ločene referenčne baze in iskanjem drevesa po metodi združevanja sosedov s prosto dostopno programsko opremo MEGA. Rezultat je filogram na podlagi združevanja sosedov, taksonomska pripadnost novega vzorca pa ustreza taksonomski pripadnosti njegovega najbližjega soseda v drevesu. Takšen pristop so uporabili Hebert in sod. (2003a). Kot trdijo Neigel in sod. (2007), je za uporabo takšnega pristopa nujno, da je referenčni nabor nukleotidnih zaporedij popoln – torej da taksoni ne manjkajo in da so zastopani z več zaporedji, ki kažejo celotno variabilnost vrste. To prav tako velja za določanje z iskalnimi algoritmi, saj tudi ti kot rezultat ponudijo najpodobnejša zaporedja. Če je na voljo več referenčnih nukleotidnih zaporedij, ki obsegajo variabilnost vrste, je zanesljivo določen vzorec, katerega zaporedje se uvršča znotraj skupine, ki predstavlja vrsto. Žal ne moremo biti prepričani, da je referenčna baza res popolna. Problematično je lahko zlasti, če se srečamo z le enim zaporedjem taksona, ki v bazi manjka, ker je verjetno, da bo določen napačno. Težavo lahko, po Neigel in sod. (2007) zaobide le prazni pristop k identifikaciji vrste (podobno je v sistemu BOLD), pri katerem predpostavimo mejo divergence, do katere neznan zaporedje z gotovostjo smatramo za pripadnika vrste, s katero se uvršča. V obravnavanih skupinah meja med variabilnostjo med taksoni in znotraj taksonov ni enotna, zato praga ne moremo posplošiti na vse taksone. Glede na povprečne znotrajvrstne razdalje obravnavanih taksonov bi lahko za dvomljivo smatrali uvrstitev zaporedja, ki od najbližjega zaporedja v bazi odstopa za več kot 2 % pri rodovih *Troglocaris* in *Niphargus* oz. več kot 7 % pri rodu *Asellus*. Če se zgodi, da se novo zaporedje ne uvršča z nizko razdaljo skupaj z nobenim zaporedjem v referenčni bazi, to lahko pomeni, da pripada vrsti, ki v bazi manjka, ali pa, da je ena od vrst v bazi bolj variabilna, kot je bilo prej znano. Prednost pristopa s filogramom je, da je intuitivno lažje interpretirati kdaj se vzorec uvršča razmeroma daleč od referenčnega taksona in bi lahko zato šlo za še neznan takson ali kontaminacijo. Pristop je manj primeren, če so genetske razdalje med sestrskimi vrstami zelo nizke, ker lahko tudi zelo podobna zaporedja z referenčnimi tvorijo v drevesu politomijo. Vsekakor pa je za zanesljivo določanje potrebna dovolj popolna referenčna baza.

Druga možnost je uporaba samostojnega BLAST («*standalone BLAST*»; več na http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast_overview.shtml) pri čemer iskanje poteka z algoritmom BLAST po bazah zaporedij, ki jih sestavi uporabnik. Potrebna programska oprema je prav tako prosto dostopna, pristop pa je uporabniku manj prijazen ter nima nekaterih prednosti pristopa z združevanjem sosedov, ob dovolj popolni referenčni bazi pa je z njim verjetno možno natančno določiti tudi zelo slabo diferencirane vrste. Podoben pristop z uporabo ITS in še nekaterih označevalcev je na voljo tudi preko spleta za določanje rodov *Trichoderma* in *Hypocrea* (<http://www.isth.info/tools/blast/blast.php>; Kopchinskiy in sod., 2005). Če je na voljo dovolj popolna baza, ki zaobjema vse vrste skupine, je tak pristop najbrž boljši od uvrščanja z drevesom, zlasti če je taksonov veliko, npr. pri rodu *Niphargus*.

4.2 ZAKLJUČKI

- Vrste rodov *Troglocaris* in *Asellus*, obravnavane v tej nalogi, so določljive na podlagi zaporedij COI, saj si vrste ne delijo haplotipov COI. V primeru *T. anophthalmus* »E-slo« in *Asellus aquaticus* velika znotrajvrstna variabilnost zaporedij COI glede na razdaljo od bližnjih taksonov zahteva obsežnejši referenčni nabor zaporedij, da je določanje lahko zanesljivo.

- Vrste rodu *Niphargus*, pri katerih je pomnoževanje COI s PCR težavno, so določljive na podlagi 28S rDNA, vendar so genetske razdalje znotraj nekaterih parov vrst izredno nizke (manjše od 0,5 %). Pri teh vrstah je lahko 28S rDNA za določanje nezadosten označevalec, razen če je znotrajvrstna variabilnost v teh primerih izredno nizka, ta pa še ni raziskana.

- Določanje obstoječih taksonov je mogoče s pomočjo prosto dostopne programske opreme, kot sta MEGA ali samostojni BLAST. Za zanesljivo določanje vrst rodu *Niphargus* je treba še precej izpopolniti referenčni nabor zaporedij, taksonomija rodu pa je še v spreminjanju, zato je do končne referenčne baze še dolga pot.

5. POVZETEK

V zadnjem času so številne molekularno-filogenetske in filogeografske raziskave evropskih makrostigobiontov pokazale na veliko mero prikrite in prezrte diverzitete v več skupinah teh živali. Uveljavljeni morfološki taksonomski znaki pri teh skupinah pogosto ne slikajo dejanskih sorodstvenih odnosov med taksoni, diagnoza je lahko težavna ali pa diagnostični morfološki znaki niso znani, zato je določanje na podlagi morfologije težavno. Zanesljivo določanje prikritih taksonov podzemnih živali je pomembno z naravovarstvenega vidika, saj je nujna natančna inventarizacija favne, ozko endemični stigobionti s svojim specifičnim okoljem pa so z vidika posegov v okolje še posebej ranljivi.

V zadnjem desetletju je veliko pozornosti zbudil pristop k določanju morfološko težavnih skupin na podlagi kratkih, standardiziranih zaporedij DNA oz. črtnih kod DNA (*DNA barcoding*). Uveljavljen standardni označevalec za določanje živali je 5' konec nukleotidnega zaporedja mitohondrijskega gena za citokrom *c* oksidazo, imenovan tudi COI. Določanje na podlagi tega zaporedja je možno preko spletne baze BOLD, ki hrani do sedaj zbrana zaporedja COI in jamči za njihovo kakovost in pravilno taksonomsko uvrstitev.

Obravnavali smo tri rodove, ki na območju Dinaridov dosegajo povečano in tudi prikrto diverzitetu: povsem stigobionski rod *Troglocaris*, pretežno stigobionski *Niphargus* ter rod *Asellus*, ki je na tem območju zastopan z jamsko vrsto in več podobnimi jamskimi populacijami. Pri rodovih *Troglocaris* in *Asellus* smo preverili možnost uporabe zaporedij COI za določanje vrst, pri rodu *Niphargus* pa smo se osredotočili na 28S rDNA kot potencialni označevalec, ker je COI pri tem rodu težko pomnožiti s PCR. Na podlagi zaporedij iz predhodnih raziskav sistematike obravnavanih rodov, ki so na voljo v bazi GenBank, smo za posamezne rodove poiskali drevesa po metodi združevanja sosedov ter izračunali povprečne genetske razdalje po Kimurinem dvoparametričnem modelu znotraj taksonov in med njimi. Rod *Troglocaris* je bil predstavljen z enajstimi taksoni pretežno iz območja Dinaridov, rod *Asellus* s tremi taksoni in rod *Niphargus* s petinpetdesetimi taksoni; vzorci za ta dva rodova izhajajo iz večjega dela Evrope, Dinaridi pa so vzorčeni poudarjeno.

Posamezni taksoni obravnavanih rodov ne delijo enakih zaporedij označevalca, torej je določanje na podlagi predlaganih zaporedij zanesljivo. Pri rodu *Troglocaris* se večina

taksonov po metodi združevanja sosedov združuje skupaj s prepričljivo podporo po metodi samovzorčenja, izjema je le klad »E-slo« *Troglocaris anophthalmus*. Pri rodu *Asellus* se zaporedja *A. kosswigi* in *Asellus* sp. iz Ukrajine združujejo z močno podporo, zaporedja *A. aquaticus* pa oblikujejo glede na *A. kosswigi* parafiletsko skupino, ki se deli na več podskupin. Pri rodu *Niphargus* se z dobro podporo združujejo skupaj zaporedja vseh vrst, zastopanih z več zaporedji. Do delnega prekrivanja znotrajvrstne in medvrstne variabilnosti prihaja pri vseh rodovih, vendar to ni veliko, povprečne znotrajvrstne razdalje pa so pri rodovih *Niphargus* ter *Troglocaris* mnogo manjše od povprečnih medvrstnih v znotraj posameznih rodov. Problematične so lahko nekatere vrste rodu *Niphargus*, pri katerih so medvrstne genetske razdalje izredno nizke, vendar to ni nujno, če je nizka tudi znotrajvrstna variabilnost. Ena izmed vrst rodu *Asellus* kaže izredno variabilnost zaporedij COI s povprečno znotrajvrstno genetsko razdaljo blizu 10 %. Med nekaterimi taksoni rodu *Troglocaris* so razdalje razmeroma nizke, medtem ko je variabilnost znotraj posameznih taksonov lahko precejšnja. S tega vidika je problematičen klad *T. anophthalmus* »E-slo«. V takšnih primerih utegne biti določanje zanesljivejše, če so taksoni zastopani z vzorcem zaporedij, ki dobro odraža njihovo variabilnost.

Zanesljivo določanje obravnavanih rodov trenutno še ni izvedljivo preko baze BOLD, predlagamo pa dostopne protokole za določanje s pomočjo prosto dostopnega filogenetskega orodja MEGA 4.0. Rod *Niphargus* je trenutno z diagnostičnimi zaporedji še pomanjkljivo zastopan, zato določanje na podlagi le-teh ni zanesljivo.

6. VIRI

6.1 CITIRANI VIRI

- Bhadury P., Austen M. C., Bilton D. T., Lamshead P. J. D., Rogers A. D., Smerdon G. R. 2006. Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes Marine Ecology Progress Series 320, 1–9
- Blaxter M. L. 2004. The promise of a DNA taxonomy. Philosophical Transactions of the Royal Society B 359, 669-679
- Blaxter M., Mann J., Chapman T., Thomas F., Whitton C., Floyd R., Abebe E. 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 360, 1462, 1935-1943
- Brower A. V.Z. 2006. Problems with DNA barcodes for species delimitation: 'ten species' of *Astraptus fulgerator* reassessed (Lepidoptera: Hesperidae) Systematics and Biodiversity 4, 2: 127–132,
- Brown W. M., Prager E. M., Wang A., Wilson A. C. 1982. Mitochondrial DNA Sequences of Primates: Tempo and Mode of Evolution. Journal of Molecular Evolution 18, 225-239
- Cywinska A., Hunter F. F., Hebert P. D. N. 2008. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. Medical and Veterinary Entomology 20, 413-424
- Dasmahapatra K.K., Mallet J. 2006. DNA barcodes: recent successes and future prospects. Heredity 97, 254–255
- DeSalle R., Egan M.G., Siddall M. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 360, 1462, 1905-1916
- Fišer C., Sket B., Trontelj P. 2008. A phylogenetic perspective on 160 years of troubled taxonomy of *Niphargus* (Crustacea: Amphipoda). Zoologica Scripta 37, 665–680
- Floyd R., Abebe E., Papert A., Blaxter M. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. Molecular Ecology 11, 839 – 850
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3,5, 294-299
- Frasier D. J., Bernatchez L. 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. Molecular Ecology 10, 2741-2752
- Gregory T. R. 2005. DNA barcoding does not compete with taxonomy. Nature 434, 1067

- Hajibabaei M., deWaard J. R., Ivanova N. V., Ratnasingham S., Dooh R. T., Kirk S. L., Mackie P.M., Hebert P. D. N. 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360, 1959–1967
- Hajibabaei M., Singer G. A. C., Hebert P. D. N., Hickey D. A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23, 4, 167-172
- Hanner, R. 2005. Proposed Standards for BARCODE Records in INSDC (BRIs). *Database Working Group, Consortium for the Barcode of Life*, http://barcoding.si.edu/PDF/DWG_data_standards-Final.pdf.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L. deWaard J. R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270, 313–321
- Hebert P. D. N., Ratnasingham S., deWaard J. R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Biology Letters, Proceedings of the Royal Society B (Suppl.)* 270, S96–S99
- Hebert 2004: Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemplak T. S., Francis C.M. 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS biology* 2, 10, 1657-1663
- Hebert P. D. N., Gregory T. R. 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic biology* 54, 5, 852–859
- Hogg I. D., Hebert P. D. N. 2004. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 82, 749–754
- Holterman M., Rybarczyk K., Van Den Elsen S., Van Megen H., Mooyman P., Santiago R. P., Bongers T., Bakker J., Helder J. 2008. A ribosomal DNA-based framework for the detection and quantification of stress-sensitive nematode families in terrestrial habitats. *Molecular Ecology Resources* 8, 23-34
- Kerr K. C. R., Stoeckle M. Y., Dove C. J., Weight L. A., Francis C. M., Hebert P. D. N. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes* 7, 525-543
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kopchinskiy A., Komon M., Kubicek C. P. 2005. TrichoBLAST: a multilocus database for Trichoderma and Hypocrea identifications. *Mycological Research News*, 109, 6, 658-660
- Kress W. J., Wurdack K. J., Zimmer E. A., Weigt L. A., Janzen D. H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *PNAS* 102, 23, 8369–8374

- Kress W. J., Erickson D. L. 2008. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *PNAS* 105, 8, 2761–2762
- Kunz W. 2006. DNA Barcoding in Taxonomy and the Perception of Species in Nature. *BioScience* 56, 2, 93
- Lahaye R., van der Bank M., Bogarin D., Warner J., Pupulin F., Gigot G., Maurin O., Duthoit S., Barraclough T. G., Savolainen V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *PNAS* 105, 8, 2923–2928
- Lefébure T., Douady C.J., Gouy M., Trontelj P., Briolay J., Gibert J. 2006. Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments. *Molecular Ecology* 15, 1797–1806
- Lefébure T., Douady C. J., Malard F., Gibert J. 2007. Testing dispersal and cryptic diversity in a widely distributed groundwater amphipod (*Niphargus rhenorhodanensis*). *Molecular phylogenetics and evolution* 42, 3, 676-686
- Meyer C. P., Paulay G. 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol* 3, 12
- Moritz C., Cicero C. 2004. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLoS Biology*, 2, 10, 1529-1531
- Neigel J., Domingo A., Stake J. 2007. DNA barcoding as a tool for coral reef conservation. *Coral Reefs* 26, 3, 487-499
- Nilsson R. H., Kristiansson E., Ryberg M., Hallenberg N., Larsson K. 2008. Intraspecific *ITS* Variability in the Kingdom *Fungi* as Expressed in the International Sequence Databases and its Implications for Molecular Species Identification. *Evolutionary Bioinformatics* 2008:4 193–201
- Pennisi E. 2007. Wanted: A Barcode for Plants. *Science*, 318, 190-191
- Ratnasingham S., Hebert P. D. N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7, 355–364
- Rubinoff D., Cameron S., Will K. 2006. A Genomic Perspective on the Shortcomings of Mitochondrial DNA for “Barcoding” Identification. *Journal of Heredity* 97, 6, 581–594
- Sarkar I. N., Planet P. J., DeSalle R. 2008. CAOS software for use in character-based DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 8, 1256-1259
- Savolainen V., Cowan R. S., Vogler A. P., Roderick G. K., Lane R. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360, 1462, 1805-1811

- Schindel D.E., Miller S. E. 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature* 435, 17
- Seifert K. A., Samson R. A., deWaard J. R., Houbraeken J., Levesque C. A., Moncalvo J., Louis-Seize G., Hebert P. D. N. 2007. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *PNAS* 104, 10, 3901–3906
- Shearer T. L., Coffroth M. A. 2008. Barcoding corals: limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. *Molecular Ecology Resources* 8, 247-255
- Sket B. 1994. Distribution of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae) and its hypogean populations at different geographic scales, with a note on *Proasellus istrianus*. *Hydrobiologia*, 287, 39–47.
- Sket B., Zakšek V. 2009. European cave shrimp species (Decapoda: Caridea: Atyidae), redefined after a phylogenetic study; redefinition of some taxa, a new genus and four new *Troglocaris* species. *Zoological Journal of the Linnaean Society*, 155, 786-818
- Smith M. A. Woodley N. E., Janzen D. H., Hallwachs W., Hebert P. D. N. 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *PNAS* 103, 10, 3657–3662
- Smith V. S. 2005. DNA Barcoding: Perspectives from a “Partnerships for Enhancing Expertise in Taxonomy” (PEET) Debate *Systematic Biology* 54, 5, 841–844
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 8, 1596–1599
- Tautz D., Arctander P., Minelli A., Thomas R. H., Vogler A. P. 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 2, 70-74
- Trontelj P., Douady C., Fišer C., Gibert J., Gorički Š., Lefébure T., Sket B., Zakšek V. 2009. A molecular test for cryptic diversity in ground water: how large are the ranges of macro-stygobionts. *Freshwater Biology* 54, 727–744
- Väinölä R., Witt J. D. S., Grabowski M., Bradbury J. H., Jazdzewski K., Sket B. 2008. Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 241–255
- Valentini A., Pompanon F., Taberlet P. 2008. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution* 24, 2, 110-117
- Vences M., Thomas M., van der Meijden A., Chiari Y., Vieites D. R. 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology* 2, 5

- Verovnik R., Sket B., Prevorcnik S., Trontelj P. 2003. Random amplified polymorphic DNA diversity among surface and subterranean populations of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Genetica* 119: 155–165
- Verovnik R., Sket B., Trontelj P. 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
- Verovnik R., Prevorčnik S., Jugovič J. 2009. Description of a neotype for *Asellus aquaticus* Linné, 1758 (Crustacea: Isopoda: Asellidae), with description of a new subterranean *Asellus* species from Europe. *Zoologischer Anzeiger* 248, 101–118
- Verovnik R. 2009. »Identiteta ukrajinskih zaporedij rodu *Asellus*«. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo (osebni vir, junij 2009).
- Ward R. D., Holmes B. H., O'Hara T. D. 2008. DNA barcoding discriminates echinoderm species. *Molecular Ecology Resources* 8, 1202–1211
- Ward R. D., Hanner R., Hebert P. D. N. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology* 74, 329–356
- Whitefield J.B., Herbert P. D. N. 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes* 6, 959–964
- Will K., Mishler B. D., Wheeler Q. D. 2005. The Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy. *Systematic Biology* 54, 5, 844–851
- Will K. W., Rubinoff D. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics* 20, 47–55
- 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
- Zakšek V., Trontelj P., Sket B., Gottstein S., Franjević D. 2009. The limits of cryptic diversity in groundwater: phylogeography of the cave shrimp *Troglocaris anophthalmus* (Crustacea: Decapoda: Atyidae). *Molecular Ecology* 18, 931–946

6.2 SPLETNI VIRI

<http://www.barcodinglife.org/>

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast_overview.shtml

<http://www.barcoding.si.edu/>

<http://www.isth.info/tools/blast/blast.php>

<http://www.barcodingbirds.org/>

<http://www.bee-bol.org/>

<http://www.fishbol.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/index.cgi?tool=barcode>

ZAHVALA

Za pomoč in usmerjanje se zahvaljujem tako mentorju doc. dr. Rudiju Verovniku kot recenzentu prof. dr. Petru Trontlju. Obema ter doc. dr. Marjanci Starčič Erjavec se zahvaljujem tudi za hiter pregled besedila in svetovanje glede popravkov. Hvala še Valeriji Zakšek in dr. Cenetu Fišerju za pomoč s podatki.

Posredno je s to nalogo povezana tudi zahvala vsem, ki so me jeseni in pozimi prenašali (in mi svetovali) v laboratoriju.

Za podporo se zahvaljujem staršem in Republiki Sloveniji. Zahvala gre tudi Blažu, ki je besedilo še enkrat pregledal, Alenki za streho nad glavo ter vsem, brez katerih bi bila moja študijska leta daljša v več kot enem smislu.

(nadaljevanje)						
GenBank acc.	Takson	Lokaliteta		lat.	long.	država
FJ426037	<i>Troglocaris planinensis</i>	Malo okence	Vrhnika	45.9514	14.2954	Slovenija
FJ426013	<i>Troglocaris planinensis</i>	Planinska jama, Rak	Planina	45.8199	14.2457	Slovenija
FJ426001	<i>Troglocaris planinensis</i>	Jama kod Komune	Novigrad	45.3643	13.5658	Hrvaška
FJ425998	<i>Troglocaris planinensis</i>	Najdena jama	Planina	45.8763	14.2455	Slovenija
FJ425996	<i>Troglocaris planinensis</i>	Jama v Mlaki	Pivka	45.6633	14.2213	Slovenija
FJ425995	<i>Troglocaris planinensis</i>	Jama v Mlaki	Pivka	45.6633	14.2213	Slovenija
FJ425991	<i>Troglocaris planinensis</i>	Mejame	Divača	45.6515	13.9877	Slovenija
FJ425975	<i>Troglocaris planinensis</i>	Čepić tunel	Kršan	45.1563	14.1620	Hrvaška
FJ425973	<i>Troglocaris planinensis</i>	Čepić tunel	Kršan	45.1563	14.1620	Hrvaška
FJ425971	<i>Troglocaris planinensis</i>	Čepić tunel	Kršan	45.1563	14.1620	Hrvaška
FJ425957	<i>Troglocaris planinensis</i>	Kačna jama	Divača	45.6820	13.9565	Slovenija
FJ425945	<i>Troglocaris planinensis</i>	Brezno pri Štivanu	Monfalcone	45.7909	13.5915	Italija
FJ425943	<i>Troglocaris planinensis</i>	Brezno pri Štivanu	Monfalcone	45.7909	13.5915	Italija
FJ425937	<i>Troglocaris planinensis</i>	Brezno pri Štivanu	Monfalcone	45.7909	13.5915	Italija
DQ641538	<i>Troglocaris planinensis</i>	Čepić tunel	Kršan	45.1563	14.1620	Hrvaška
DQ641537	<i>Troglocaris planinensis</i>	Planinska jama	Planina	45.8199	14.2457	Slovenija
DQ641535	<i>Troglocaris planinensis</i>	Osapska jama	Osp	45.5730	13.8620	Slovenija
DQ641534	<i>Troglocaris planinensis</i>	Labodnica	Trebiciano	45.6845	13.8286	Italija
DQ641533	<i>Troglocaris planinensis</i>	Osapska jama	Osp	45.5730	13.8620	Slovenija
DQ641532	<i>Troglocaris planinensis</i>	Osapska jama	Osp	45.5730	13.8620	Slovenija
DQ641531	<i>Troglocaris planinensis</i>	Kačna jama	Divača	45.6820	13.9565	Slovenija
DQ641530	<i>Troglocaris planinensis</i>	Labodnica	Trebiciano	45.6845	13.8286	Italija
DQ641529	<i>Troglocaris planinensis</i>	Kačna jama	Divača	45.6820	13.9565	Slovenija
DQ641565	<i>Troglocaris hercegovinensis</i>	Obodska pečina	Rijeka Cmojevića	42.3527	19.0056	Črna Gora
DQ641564	<i>Troglocaris hercegovinensis</i>	Obodska pečina	Rijeka Cmojevića	42.3527	19.0056	Črna Gora
DQ641563	<i>Troglocaris hercegovinensis</i>	Vjetrenica	Popovo polje	42.8457	17.9839	BiH
DQ641558	<i>Troglocaris pretneri</i>	Vjetrenica	Popovo polje	42.8457	17.9839	BiH
DQ641557	<i>Troglocaris pretneri</i>	Vjetrenica	Popovo polje	42.8457	17.9839	BiH
DQ641561	<i>Troglocaris prasence</i>	Obodska pečina	Rijeka Cmojevića	42.3527	19.0056	Črna Gora
DQ641559	<i>Troglocaris prasence</i>	Obodska pečina	Rijeka Cmojevića	42.3527	19.0056	Črna Gora
DQ641555	<i>Troglocaris bosnica</i>	Dabarska pečina	Sanski most	44.7107	16.6358	BiH
DQ641554	<i>Troglocaris bosnica</i>	Dabarska pečina	Sanski most	44.7107	16.6358	BiH
DQ641553	<i>Troglocaris bosnica</i>	Suvaja pečina		44.6981	16.4729	BiH
DQ641562	<i>Troglocaris sp.</i>	Suvaja pečina		44.6981	16.4729	BiH
DQ641568	<i>Gallocaris inermis</i>	Grotte des Cent-Fons	Montpellier	43.8044	3.6497	Francija
DQ641567	<i>Gallocaris inermis</i>	Sauve	Montpellier	43.9408	3.9519	Francija
DQ641566	<i>Gallocaris inermis</i>	Sauve	Montpellier	43.9408	3.9519	Francija

Priloga B: Seznam uporabljenih zaporedij in lokalitet rodu *Asellus*

GenBank acc.	Takson	Lokaliteta	regija	lat.	long.	država
AY531825	<i>Asellus aquaticus</i>	Gašpinova jama	Logatec	45.9106	14.2406	Slovenija
AY531824	<i>Asellus aquaticus</i>	Gašpinova jama	Logatec	45.9106	14.2406	Slovenija
AY531823	<i>Asellus aquaticus</i>	Gašpinova jama	Logatec	45.9106	14.2406	Slovenija
AY531822	<i>Asellus aquaticus</i>	Gašpinova jama	Logatec	45.9106	14.2406	Slovenija
AY531821	<i>Asellus aquaticus</i>	Krška jama	Ivančna Gorica	45.9106	14.7758	Slovenija
AY531820	<i>Asellus aquaticus</i>	Otok	Cerknica	45.8903	14.3808	Slovenija
AY531819	<i>Asellus aquaticus</i>	Otok	Cerknica	45.8903	14.3808	Slovenija
AY531818	<i>Asellus aquaticus</i>	Sava, Zbilje		46.1567	14.4253	Slovenija
AY531817	<i>Asellus aquaticus</i>	Sava, Zbilje		46.1567	14.4253	Slovenija
AY531816	<i>Asellus aquaticus</i>	Sava, Zbilje		46.1567	14.4253	Slovenija
AY531815	<i>Asellus aquaticus</i>	Sava, Zbilje		46.1567	14.4253	Slovenija
AY531814	<i>Asellus aquaticus</i>	Sava, Zbilje		46.1567	14.4253	Slovenija
AY531813	<i>Asellus aquaticus</i>	Otok	Cerknica	45.8903	14.3808	Slovenija
AY531812	<i>Asellus aquaticus</i>	Otok	Cerknica	45.8903	14.3808	Slovenija
AY531811	<i>Asellus aquaticus</i>	Otok	Cerknica	45.8903	14.3808	Slovenija
AY531810	<i>Asellus aquaticus</i>	Sušje	Ribnica	45.7536	14.6881	Slovenija
AY531809	<i>Asellus aquaticus</i>	Sušje	Ribnica	45.7536	14.6881	Slovenija
AY531808	<i>Asellus aquaticus</i>	Osdorf	Hamburg	45.7536	14.6881	Slovenija
AY531804	<i>Asellus aquaticus</i>	Planinska jama - Rak	Planina	45.8161	14.2444	Slovenija
AY531803	<i>Asellus aquaticus</i>	Planinska jama - Rak	Planina	45.8161	14.2444	Slovenija
AY531802	<i>Asellus aquaticus</i>	Planinska jama - Rak	Planina	45.8161	14.2444	Slovenija
AY531801	<i>Asellus aquaticus</i>	Planinska jama - Pivka	Planina	45.8161	14.2444	Slovenija
AY531800	<i>Asellus aquaticus</i>	Planinska jama - Pivka	Planina	45.8161	14.2444	Slovenija
AY531799	<i>Asellus aquaticus</i>	Planinska jama - Pivka	Planina	45.8161	14.2444	Slovenija
AY531798	<i>Asellus aquaticus</i>	Rakek	Cerknica	45.8322	14.2639	Slovenija
AY531797	<i>Asellus aquaticus</i>	Pivka jama	Postojna	45.8044	14.2050	Slovenija
AY531796	<i>Asellus aquaticus</i>	Veliki Otok	Postojna	45.7881	14.1972	Slovenija
AY531795	<i>Asellus aquaticus</i>	Črna jama	Kočevje	45.7986	14.2081	Slovenija
AY531794	<i>Asellus aquaticus</i>	Črna jama	Kočevje	45.7986	14.2081	Slovenija
AY531790	<i>Asellus aquaticus</i>	Lučka jama	Grosuplje	45.9181	14.7208	Slovenija
AY531789	<i>Asellus aquaticus</i>	Lučka jama	Grosuplje	45.9181	14.7208	Slovenija
AY531788	<i>Asellus aquaticus</i>	Lučka jama	Grosuplje	45.9181	14.7208	Slovenija
AY531787	<i>Asellus aquaticus</i>	Lučka jama	Grosuplje	45.9181	14.7208	Slovenija
AY531786	<i>Asellus aquaticus</i>	Novo Mesto	River Krka	45.8228	15.1933	Slovenija
AY531785	<i>Asellus aquaticus</i>	Novo Mesto	River Krka	45.8228	15.1933	Slovenija
AY531784	<i>Asellus aquaticus</i>	Homps, Lezignan		43.2669	2.7194	Slovenija (se nadaljuje)

(nadaljevanje)						
GenBank acc.	Takson	Lokaliteta	regija	lat.	long.	država
AY531783	<i>Asellus aquaticus</i>	Homps, Lezignan		43.2669	2.7194	Slovenija
AY531782	<i>Asellus aquaticus</i>	jama Viršnica	Grosuplje	45.9069	14.7033	Slovenija
AY531781	<i>Asellus aquaticus</i>	jama Viršnica	Grosuplje	45.9069	14.7033	Slovenija
AY531780	<i>Asellus aquaticus</i>	jama Viršnica	Grosuplje	45.9069	14.7033	Slovenija
AY531779	<i>Asellus aquaticus</i>	Bakovci		46.6064	16.1656	Slovenija
AY531778	<i>Asellus aquaticus</i>	Bakovci		46.6064	16.1656	Slovenija
AY531777	<i>Asellus aquaticus</i>	Bakovci		46.6064	16.1656	Slovenija
AY531776	<i>Asellus aquaticus</i>	Bakovci		46.6064	16.1656	Slovenija
AY531775	<i>Asellus aquaticus</i>	Planinska jama, Pivka	Planina	45.8161	14.2444	Slovenija
AY531771	<i>Asellus aquaticus</i>	Dolga vas	Kočevje	45.9069	14.7033	Slovenija
AY531770	<i>Asellus aquaticus</i>	Dolga vas	Kočevje	45.9069	14.7033	Slovenija
AY531769	<i>Asellus aquaticus</i>	Dolga vas	Kočevje	45.9069	14.7033	Slovenija
AY531768	<i>Asellus aquaticus</i>	Rakov Škocjan	Cerknica	45.8322	14.2639	Slovenija
AY531767	<i>Asellus aquaticus</i>	Pivka jama	Postojna	45.8044	14.2050	Slovenija
AY531766	<i>Asellus aquaticus</i>	Pivka jama	Postojna	45.8044	14.2050	Slovenija
AY531761	<i>Asellus aquaticus</i>	Otok	Cerknica	45.8903	14.3808	Slovenija
AY531760	<i>Asellus aquaticus</i>	Veliki Otok	Postojna	45.7881	14.1972	Slovenija
AY531759	<i>Asellus aquaticus</i>	Veliki Otok	Postojna	45.7881	14.1972	Slovenija
AY531758	<i>Asellus aquaticus</i>	Črna jama	Kočevje	45.7986	14.2081	Slovenija
AY531757	<i>Asellus aquaticus</i>	Črna jama	Kočevje	45.7986	14.2081	Slovenija
DQ144893	<i>Asellus aquaticus</i>	Hagymás-lapos	Tiszafüred	47.5581	20.9247	Madžarska
DQ144892	<i>Asellus aquaticus</i>	Hagymás-lapos	Tiszafüred	47.5581	20.9247	Madžarska
DQ144891	<i>Asellus aquaticus</i>	Hagymás-lapos	Tiszafüred	47.5581	20.9247	Madžarska
DQ144890	<i>Asellus aquaticus</i>	Hagymás-lapos	Tiszafüred	47.5581	20.9247	Madžarska
DQ144888	<i>Asellus aquaticus</i>	Matelica	Ancona	43.2550	13.0117	Italija
DQ144887	<i>Asellus aquaticus</i>	Matelica	Ancona	43.2550	13.0117	Italija
DQ144885	<i>Asellus aquaticus</i>	Evros delta	Feres	40.8508	26.1775	Grčija
DQ144884	<i>Asellus aquaticus</i>	Evros delta	Feres	40.8508	26.1775	Grčija
DQ144883	<i>Asellus aquaticus</i>	Vryssia	Farsala	39.2700	22.3161	Grčija
DQ144882	<i>Asellus aquaticus</i>	Vryssia	Farsala	39.2700	22.3161	Grčija
DQ144881	<i>Asellus aquaticus</i>	Vryssia	Farsala	39.2700	22.3161	Grčija
DQ144880	<i>Asellus aquaticus</i>	Vryssia	Farsala	39.2700	22.3161	Grčija
DQ144879	<i>Asellus aquaticus</i>	jezero Paralimini	Thiva	38.4469	23.3778	Grčija
DQ144878	<i>Asellus aquaticus</i>	jezero Paralimini	Thiva	38.4469	23.3778	Grčija
DQ144877	<i>Asellus aquaticus</i>	jezero Paralimini	Thiva	38.4469	23.3778	Grčija
DQ144876	<i>Asellus aquaticus</i>	jezero Paralimini	Thiva	38.4469	23.3778	Grčija
DQ144875	<i>Asellus aquaticus</i>	jezero Paralimini	Thiva	38.4469	23.3778	Grčija
DQ144874	<i>Asellus aquaticus</i>	Sv. Naum	Ohrid	40.9478	20.7817	Makedonija (se nadaljuje)

(nadaljevanje)						
GenBank acc.	Takson	Lokaliteta	regija	lat.	long.	država
AY531828	<i>Asellus aquaticus</i>	Malo okence	Vrhnika	45.9514	14.2989	Slovenija
AY531827	<i>Asellus aquaticus</i>	Malo okence	Vrhnika	45.9514	14.2989	Slovenija
AY531826	<i>Asellus aquaticus</i>	Malo okence	Vrhnika	45.9514	14.2989	Slovenija
AY531807	<i>Asellus aquaticus</i>	Veliki Otok	Postojna	45.7881	14.1972	Slovenija
AY531806	<i>Asellus aquaticus</i>	Planinska jama, Pivka	Planina	45.8161	14.2444	Slovenija
AY531805	<i>Asellus aquaticus</i>	Rakek	Cerknica	45.8322	14.2639	Slovenija
AY531774	<i>Asellus aquaticus</i>	Rinža	Kočevje			Slovenija
AY531773	<i>Asellus aquaticus</i>	Rinža	Kočevje			Slovenija
AY531772	<i>Asellus aquaticus</i>	Rinža	Kočevje			Slovenija
DQ144889	<i>Asellus aquaticus</i>	Čret	Ptuj	46.4758	15.8031	Slovenija
DQ144886	<i>Asellus aquaticus</i>	reka Don	Sheffield	53.4944	1.2478	Velika Britanija
DQ144830	<i>Asellus aquaticus</i>	jama Zoodhos I	Santorini	36.4528	25.5056	Grčija
DQ144829	<i>Asellus aquaticus</i>	jama Zoodhos I	Santorini	36.4528	25.5056	Grčija
DQ144828	<i>Asellus aquaticus</i>	jama Zoodhos I	Santorini	36.4528	25.5056	Grčija
DQ144827	<i>Asellus aquaticus</i>	jama Zoodhos I	Santorini	36.4528	25.5056	Grčija
DQ144798	<i>Asellus aquaticus</i>	Dekmanca	Kozje	46.9558	15.6322	Slovenija
FJ749279	<i>Asellus aquaticus</i>	Ulva	Uppsala	59.9128	17.5758	Švedska
FJ749278	<i>Asellus aquaticus</i>	Ulva	Uppsala	59.9128	17.5758	Švedska
FJ749277	<i>Asellus aquaticus</i>	Ulva	Uppsala	59.9128	17.5758	Švedska
FJ749276	<i>Asellus aquaticus</i>	Ulva	Uppsala	59.9128	17.5758	Švedska
FJ749275	<i>Asellus kosswigi</i>	S. Giovanni al Timavo	Monfalcone/Tržič	45.7883	13.5956	Italija
AY531765	<i>Asellus kosswigi</i>	Labodnica	Trieste/Trst	45.6842	13.9167	Slovenija
AY531764	<i>Asellus kosswigi</i>	Labodnica	Trieste/Trst	45.6842	13.9167	Slovenija
AY531763	<i>Asellus kosswigi</i>	Labodnica	Trieste/Trst	45.6842	13.9167	Slovenija
AY531762	<i>Asellus kosswigi</i>	Labodnica	Trieste/Trst	45.6842	13.9167	Slovenija
AY531793	<i>Asellus kosswigi</i>	Labodnica	Trieste/Trst	45.6842	13.9167	Slovenija
AY531792	<i>Asellus kosswigi</i>	Labodnica	Trieste/Trst	45.6842	13.9167	Slovenija
AY531791	<i>Asellus kosswigi</i>	Labodnica	Trieste/Trst	45.6842	13.9167	Slovenija

Priloga C: Seznam uporabljenih zaporedij in lokalitet rodu *Niphargus*

GenBank acc.	Takson	Lokaliteta	regija	država
EF617260	<i>Niphargus aberrans</i>	Snebrje	Ljubljana	Slovenija
EF617265	<i>Niphargus aquilex</i>	Little stour		Velika Britanija
EF617287, EF617288	<i>Niphargus arbiter</i>	Tounjčica	Ogulin	Hrvaška
EF617280	<i>Niphargus balcanicus</i>	Vjetrenica	Popovo Polje	BiH
EF617271	<i>Niphargus boskovici</i>	Bjelušica	Popovo Polje	BiH
EF617252	<i>Niphargus camiolicus</i>	Lukenjska jama	Novo mesto	Slovenija
EF617296	<i>Niphargus dalmatinus</i>	Vrana	Zadar	Hrvaška
EU693296	<i>Niphargus dimorphopus</i>	Gulpen	Limburg	Nizozemska
EF617247	<i>Niphargus dohati</i>	Rakov škocjan	Rakek	Slovenija
EU693297	<i>Niphargus dolichopus</i>	Suvaja pečina		BiH
EF617297	<i>Niphargus elegans</i>	San Pancrazio	Verona	Italija
EU693298	<i>Niphargus factor</i>	Vjetrenica	Popovo Polje	BiH
EF617253	<i>Niphargus fongi</i>	Koblarska jama		Slovenija
EU693300	<i>Niphargus grandii</i>	potok Torre	Ruda	Italija
EU693301	<i>Niphargus hadzii</i>	Vrhnika, izvir "Pod orehom"	Ljubljana	Slovenija
EU693302	<i>Niphargus hrabei</i>	Lupoglav, potok ob cesti	Zagreb	Hrvaška
EF617272	<i>Niphargus hvarensis</i>	Mlini	Cavtat	Hrvaška
EF617273	<i>Niphargus hvarensis</i>	Trsteno, izvir ob spomeniku pri platani	Dubrovnik	Hrvaška
EU693303	<i>Niphargus hvarensis</i>	Slano, izvir za cerkvijo		Hrvaška
EU693304	<i>Niphargus illidzensis</i>	vrelo Bosne	Sarajevo	BiH
EU693305	<i>Niphargus karamani</i>	Fram 119, vodnjak	Maribor	Slovenija
EU693306	<i>Niphargus kenki</i>	Sodna vas 25, izvir pod hišo	Podčetrtek	Slovenija
EU693308	<i>Niphargus kochianus</i>	St. Albans		Velika Britanija
EF617274	<i>Niphargus krameri</i>	potok Brestovac	Pazin	Hrvaška
EF617257	<i>Niphargus labacensis</i>	Tomačevo	Ljubljana	Slovenija
EF617300	<i>Niphargus lessiniensis</i>	Grotta dell Aqua, Ponte de Veja	Verona	Italija
EF617241	<i>Niphargus longicaudatus</i>	potok ob cesti Monte Faito-Vico Equense	Neapelj	Italija
EU693311	<i>Niphargus longiflagellum</i>	Podpeška jama	Videm, Dobropolje	Slovenija
EU693312	<i>Niphargus lourensis</i>	izvir reke Louros	Vouliasta	Grčija
EF617279	<i>Niphargus maximus</i>	Biljani izvori	Ohrid	Makedonija
EU693314	<i>Niphargus novomestanus</i>	Tominčev studenec, Dvor	Žužemberk	Slovenija
EU693315	<i>Niphargus orcinus</i>	Križna jama	Lož	Slovenija
EU693316	<i>Niphargus pachytelson</i>	Podpeška jama	Videm, Dobropolje	Slovenija
EF617244	<i>Niphargus pasquinii</i>	Sorgenti S. Vittorino	Rieti	Italija
EF617258	<i>Niphargus pectinicauda</i>	Tomačevo	Ljubljana	Slovenija
EU693317	<i>Niphargus podpecanus</i>	Podpeška jama	Videm, Dobropolje	Slovenija
EF617282	<i>Niphargus polymorphus</i>	Obodska pečina	Rijeka Cmojevića	Črna Gora
EU693318	<i>Niphargus pupetta</i>	Tomačevo	Ljubljana	Slovenija
EF617302	<i>Niphargus puteanus</i>	izvir S od gostišča Zur Walba; cesta Pentling - Matting	Regensburg	Nemčija
EF617283	<i>Niphargus rejici</i>	Podpeško jezero	Ig	Slovenija
EF617289	<i>Niphargus salonitanus</i>	izvir pod cerkvijo Stomarija, Kaštel Stari	Split	Hrvaška
EU693320	<i>Niphargus sanctinaumi</i>	Sv. Naum	Ohrid	Makedonija
EF617261	<i>Niphargus scopicauda</i>	Huda luknja	G. Dolič	Slovenija
EU693322	<i>Niphargus slovenicus</i>	Stražišče	Kranj	Slovenija
EF617270	<i>Niphargus sphagnicolis</i>	Mostec	Ljubljana	Slovenija
EU693323	<i>Niphargus spinulifemur</i>	Hrastovlje	Istra	Slovenija
				(se nadaljuje)

(nadaljevanje)				
GenBank acc.	Takson	Lokaliteta	regija	država
EU693324	<i>Niphargus spoeckeri</i>	Pivka jama	Postojna	Slovenija
EF617284	<i>Niphargus stenopus</i>	jama pod gradom Luknja	Novo Mesto	Slovenija
EU693325	<i>Niphargus stygius</i>	Predjama	Postojna	Slovenija
EF617263	<i>Niphargus tatrensis</i>	Lodowe zrodlo	Zakopane	Poljska
EU693327	<i>Niphargus timavi</i>	Trebbicciano (Labodnica)	Trieste/Trst	Italija
EF617281	<i>Niphargus trullipes</i>	Vjetrenica	Popovo Polje	BiH
EU693328	<i>Niphargus valvasori</i>	Križna jama	Lož	Slovenija
EF617298	<i>Niphargus vinodolensis</i>	Ceroviči	Novi Vinodolski	Hrvaška
EU693329	<i>Niphargus vjetrenicensis</i>	Vjetrenica	Popovo Polje	BiH
EF617250	<i>Niphargus wolffi</i>	Križna jama	Lož	Slovenija
EF617295, EU693330	<i>Niphargus zagrebensis</i>	Čučerje		Hrvaška

Priloga D: Pomnoževanje tarčnih nukleotidnih zaporedij

- Rodova *Asellus* in *Troglocaris*

Zaporedja COI pomnožimo z začetnima oligonukleotidoma LCO 1490 in HCO 2198 (Folmer in sod., 1994);

HCO 2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

LCO 1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'

Program je sledeč (po Zakšek in sod., 2007):

- začetna denaturacija 3 min pri 94°C;
- 34 ciklov po 45 s pri 94 °C, 45 s pri 48 °C, 1 min pri 72 °C;
- zaključno podaljševanje 3 min pri 72 °C.

- Rod *Niphargus*

Zaporedja 28S rDNA pomnožimo z začetnima oligonukleotidoma Verovnika in sod. (2005) ter Zakšek in sod. (2007):

Fw: 5'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTT-3'

Rew: 5'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTT-3'

Program je sledeč (po Zakšek in sod., 2007):

- začetna denaturacija 3 min pri 94°C;
- 34 ciklov po 45 s pri 94 °C, 30 s pri 48 °C, 80 s pri 72 °C;
- zaključno podaljševanje 3 min pri 72 °C.