

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Janja REPINA POTOČKI

**FILOGENIJA IN FILOGEOGRAFIJA POTOČNIH
RAKOV RODU *Austropotamobius* (CRUSTACEA:
DECAPODA) Z RAZJASNITVIJO POLOŽAJA
SLOVENSKIH POPULACIJ**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Janja REPINA POTOČKI

**FILOGENIJA IN FILOGEOGRAFIJA POTOČNIH RAKOV RODU
Austropotamobius (CRUSTACEA: DECAPODA) Z RAZJASNITVIJO
POLOŽAJA SLOVENSKIH POPULACIJ**

MAGISTRSKO DELO

**PHYLOGENY AND PHYLOGEOGRAPHY OF CRAYFISH GENUS
Austropotamobius (CRUSTACEA: DECAPODA) BY CLARIFYING THE
SITUATION OF THE SLOVENIAN POPULATIONS**

MASTER OF SCIENCE THESIS

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu senata Biotehniške fakultete z dne 04. 05. 2015 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za magistrski podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanja magisterija znanosti iz področja genetike. Za mentorja magistrske naloge je bil imenovan prof. dr. Peter Trontelj.

Magistrsko delo je bilo opravljeno na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Mentor: prof. dr. Peter Trontelj

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Rudi Verovnik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: viš. znan. sod. dr. Aleš Snoj

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: izr. prof. dr. Elena Bužan

Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije

Datum zagovora: 20.4.2016

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

Janja Repina Potočki

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Md
DK	UDK: 575:595.3(043)=163.6
KG	potočni raki/rod <i>Austropotamobius/A. pallipes/A. torrentium</i> /molekularna evolucija/filogenetika/filogenetska drevesa/filogeografija
AV	REPINA POTOČKI, Janja, univ. dipl. biol.
SA	TRONTELJ, Peter (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje genetike
LI	2016
IN	FILOGENIJA IN FILOGEOGRAFIJA POTOČNIH RAKOV RODU <i>Austropotamobius</i> (CRUSTACEA: DECAPODA) Z RAZJASNITVIJO POLOŽAJA SLOVENSKIH POPULACIJ
TD	Magistrsko delo
OP	XIII, 94 str., 6 pregl., 21 sl., 5 pril., 97 vir.
IJ	sl
JL	sl/en
AI	

Namen raziskave je bil razjasniti taksonomijo evropskih potočnih rakov rodu *Austropotamobius*. V raziskavi smo uporabili tri genetske označevalce, dva iz mitohondrijskega genoma (odsek gena za 16S rDNA in odsek gena CO1) in enega jadrnega (ITS2). Oba mitohondrijska gena sta bila predmet številnih predhodnih filogenetskih in filogeografskih raziskav potočnih rakov, ki pa nejasnost v biološki sistematiki omenjenega rodu niso razjasnile. Naš prispevek je bil zaobjeti celotno geografsko območje, ki ga rod *Austropotamobius* naseljuje in na osnovi vseh treh DNA zaporedij rekonstruirati njegovo filogenijo. Raziskava je potekala v dveh sklopih: (1) Analiza filogenije in filogeografije taksona *A. pallipes* sensu lato, ki je v novejši znanstveni literaturi pogosto označena kot kompleks vrst ter preveriti hipotezo o obstoju večih hipotetičnih kriptičnih vrst. (2) Analiza filogenije in filogeografije taksona *A. torrentium* ter preveriti prisotnost hipotetičnih vrst in/ali znotrajvrstnih filetskih linij. Za vsak niz podatkov smo po kriteriju AICc ocenili najustreznejši model DNA substitucij za vse tri genetske označevalce ter jih obravnavali ločeno in združeno. Za razreševanje taksonomskih nejasnosti smo v raziskali uporabili več metod: Metodo največjega verjetja (ML), Bayesov pristop (BI) ter metode za ugotavljanja mrežnih sorodstvenih odnosov (MJN). Preverili smo tudi uporabnost sodobnih statističnih algoritmov za molekularno delimitacijo novih hipotetičnih vrst (metodi ABGD in PTP) in postavitev primarne vrstne hipoteze, kar še za taksonomijo rodu *Austropotamobius* ni bilo izvedeno. Na osnovi rezultatov filogenetskih študij smo za takson *A. pallipes* sensu lato potrdili hipotezo o obstoju dveh kladov v rangu vrste *A. pallipes* in *A. italicus*. Slovenske populacije koščanca (primorski koščak) pripadajo filetski liniji *A. italicus*, natančneje dvem filogeografskim skupinam tega klada: Istra1 in SEAlps+W Balkans. Za takson *A. torrentium*, smo ugotovili, da je konglomerat 8 filetskih linij, ki so genetsko precej raznolike. Pet filogeografskih skupin iz področja severnega in centralnega Dinarskega gorstva je striktno alopatričnih, med seboj in od preostalih treh haplotipskih skupin jih ločuje velika genetska razdalja zato smo jih opredelili kot potencialne vrste, z vidika naravovarstva jih lahko opredelimo kot evolucijsko pomembne enote (ESU). Slovenske populacije koščaka *A. torrentium* pripadajo dvem haplotipskim skupinam tega klada: Kolpa ter CSE. Z rezultati molekularnih filogenetskih analiz smo dopolnili obstoječe znanje o filogeniji in filogeografiji vrst rodu *Austropotamobius* ter ga pregledno uredili. Rezultati predstavljali pomemben prispevek k taksonomiji in varstveni biologiji rodu *Austropotamobius* v Sloveniji in tudi širše.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
DC UDK: 575:595.3(043)=163.6
CX crayfish/genus *Austropotamobius*/A. *pallipes*/A. *torrentium*/molecular evolution/phylogenetics/phylogenetic trees/phylogeography
AU REPINA POTOČKI, Janja
AA TRONTELJ, Peter (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Genetics
PY 2016
TI PHYLOGENY AND PHYLOGEOGRAPHY OF CRAYFISH GENUS *Austropotamobius* (CRUSTACEA: DECAPODA) BY CLARIFYING THE SITUATION OF THE SLOVENIAN POPULATIONS
DT Master Thesis
NO XIII, 94 p., 6 tab., 21 fig., 5 ann., 97 ref.
LA sl
AL sl/en
AB

The purpose of this study was to clarify the taxonomy of European crayfish genus *Austropotamobius*. In this study, we used three genetic markers, two from the mitochondrial genome (part of ribosomal gene 16S rDNA and a portion of the cytochrome c oxidase subunit 1(CO1) and one nuclear (ITS2, Internal transcript spacer). Both mitochondrial genes have been the subject of several previous phylogenetic and phylogeographic studies, but there remain taxonomic and systematic uncertainties in genus. Our aim was to encompass the entire geographical area that genus *Austropotamobius* inhabits and to reconstruct the phylogeny on the basis of the three DNA sequences. The study was conducted in two parts: (1) Analysis of phylogenetic relationships and phylogeography of the taxon A. *pallipes* sensu lato, which is often characterized as a “species-complex” and verification of the existence of several hypothetical cryptic species. (2) Analysis of phylogenetic relationships and phylogeography of the taxon A. *torrentium* and verification of the presence of intraspecific phyletic lineages. For all three genetic markers evolutionary model of DNA substitutions was determined, markers were analyzed separately and combined (concatenated). To resolve taxonomic uncertainties we used several methods: Maximum likelihood method (ML), Bayesian approach (BI) and methods for determining the reticulate relationships (method MJN). We also tested the usefulness of modern statistical algorithms for molecular delimitation of species (methods ABGD and PTP) and a primary species hypothesis (PSHs). Based on the results of phylogenetic studies of the taxon A. *pallipes* sensu lato we confirmed the hypothesis of the existence of two clades at species level A. *pallipes* and A. *italicus*. Slovenian populations belong to taxon A. *italicus*, more specifically to two phylogeographical groups: Istra1 and SEAlps + W Balkans. We found out that taxon A. *torrentium* is a conglomerate of 8 phyletic lineages that are genetically quite diverse. Five of them, geographically placed within the northern-central Dinaric region, are strictly allopatric and each of them comprises genetically distinct phylogroup. In terms of biological conservation, this isolated phylogroups of stone crayfish should be considered as ESU and therefore should be given the highest conservation priority. Slovenian population of A. *torrentium* belonging to two haplogroups: Kupa (sl. Kolpa) and CSE. The results of molecular phylogenetic analyzes represent an important contribution to taxonomy and conservation biology of the genus *Austropotamobius* in Slovenia and beyond.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
SLOVARČEK	XII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN CILJ RAZISKOVANJA	1
1.1.1 Razreševanje taksonomske nejasnosti rodu <i>Austropotamobius</i>	1
1.1.2 Prispevek k naravovarstveni praksi	2
1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 POTOČNI RAKI (DECAPODA: ASTACIDEA) – RAZŠIRJENOST IN BIODIVERZITETA	4
2.2 FILOGENIJA POTOČNIH RAKOV	5
2.3 ROD <i>Austropotamobius</i> IN TAKSONOMSKA PROBLEMATIKA	9
2.3.1 Filogeografija vrst iz rodu <i>Austropotamobius</i>	10
2.3.2 Klad <i>Austropotamobius pallipes</i>	11
2.3.2.1 Taksonomija taksona <i>A. pallipes</i> sensu lato	13

2.3.3 Klad <i>Austropotamobius torrentium</i>	15
2.3.3.1 Taksonomija taksona <i>A. torrentium</i>	15
2.4 OSNOVE EVOLUCIJSKE BIOLOGIJE IN MOLEKULARNA FILOGENETIKA	16
2.4.1 Filogenetska drevesa	19
2.5 OSNOVE BIOLOŠKE SISTEMATIKE IN KONCEPT VRSTE	22
2.5.1 Taksonomija	23
2.5.2 Koncept vrste	24
3 MATERIALI IN METODE	26
3.1 OPIS PROUČEVANIH VZORCEV	26
3.1.1 Takson <i>A. pallipes</i> sensu lato	26
3.1.2 Takson <i>A. torrentium</i>	29
3.2 IZOLACIJA DNA	31
3.3 POMNOŽEVANJE DNA Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO (PCR)	32
3.4 ČIŠČENJE PRODUKTOV PCR	34
3.5 DOLOČANJE IN ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ	34
3.6 OCENITEV GENETSKE RAZNOLIKOSTI	35
3.7 FILOGENETSKE ANALIZE	35
3.8 ANALIZA MREŽNIH ODNOsov TER FILOGEOGRAFIJA TAKSONOV <i>A. pallipes</i> sensu lato IN <i>A. torrentium</i>	37
3.9 DOLOČITEV HIPOTETIČNIH VRST Z METODAMI ZA RAZMEJITEV VRST Z DNA	38
4 REZULTATI	40

4.1 RAZREŠEVANJE TAKSONOMSKIH NEJASNOSTI RODU <i>Austropotamobius</i>	40
 4.1.1 Ocena genetske raznolikosti	40
 4.1.2 Takson <i>A. pallipes</i>	41
4.1.2.1 Filogenetske analize taksona <i>A. pallipes</i> sensu lato	41
4.1.2.2 Določanje hipotetičnih vrst z metodami za razmejitev vrst na osnovi DNA	48
4.1.2.3 Filogeografska obravnava taksona <i>A. pallipes</i>	52
 4.1.3 Takson <i>A. torrentium</i>	55
4.1.3.1 Filogenetske analize taksona <i>A. torrentium</i>	55
4.1.3.2 Analiza števila hipotetičnih vrst z metodami za razmejitev vrst na osnovi DNA	62
4.1.3.3 Filogeografska obravnava taksona <i>A. torrentium</i>	64
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	69
 5.1 RAZPRAVA	69
 5.1.1 Takson <i>A. pallipes</i> sensu lato: delitev na dve hipotetični vrsti <i>A. pallipes</i> in <i>A. italicus</i>	70
 5.1.2 Takson <i>A. torrentium</i>	73
 5.1.3 Naravovarstveni aspekt	76
 5.2 SKLEPI	79
6 POVZETEK (SUMMARY)	81
 6.1 POVZETEK	81
 6.2 SUMMARY	82
7 VIRI	84
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Morfološka karakterizacija za rod <i>Austropotamobius</i> (Govedič, 2006; Souty-Grosset in sod., 2006)	13
Preglednica 2:	Oznake preučevanih vzorcev za takson <i>A. pallipes</i> sensu lato	27
Preglednica 3:	Oznake preučevanih vzorcev za takson <i>A. torrentium</i>	30
Preglednica 4:	Evolucijski model za posamezne DNA lokuse za takson <i>A. pallipes</i>	41
Preglednica 5:	Haplotske skupine/vrstna/podvrstna imena podvrst za identificirane filetske linije	43
Preglednica 6:	Evolucijski model za posamezne DNA lokuse za takson <i>A.</i> <i>torrentium</i>	56

KAZALO SLIK

Slika 1:	Raznolikost sladkovodnih rakov (Crandall in Buhay, 2008)	4
Slika 2:	Razporeditev družin potočnih rakov (Souty-Grosset in sod., 2006)	7
Slika 3:	Organizacija jedrne ribosomske DNA (Stage in Eickbush, 2009)	22
Slika 4:	Zemljevid preučevanega areala za takson <i>A. pallipes</i> sensu lato z označenimi vzorčnimi mesti in haplotipskimi skupinami	28
Slika 5:	Zemljevid preučevanega areala za takson <i>A. torrentium</i> z označenimi vzorčnimi mesti in haplotipskimi skupinami	31
Slika 6:	Bayesov filogram za takson <i>A. pallipes</i> sensu lato na podlagi lokusa 16S rRNA	44
Slika 7:	Bayesov filogram za takson <i>A. pallipes</i> sensu lato na podlagi lokusa CO1	45
Slika 8:	Bayesov filogram za takson <i>A. pallipes</i> sensu lato na podlagi nDNA ITS2	46
Slika 9:	Bayesov filogram za takson <i>A. pallipes</i> sensu lato na podlagi združenih zaporedij	47
Slika 10:	Graf analize z metodo ABGD analize za sekvence ITS2 za takson <i>A. pallipes</i> sensu lato	49
Slika 11:	Analiza z metodo MJN za takson <i>A. pallipes</i> sensu lato (lokus CO1)	53
Slika 12:	Zemljevid raporeditve filogeografskih skupin za takson <i>A. pallipes</i> sensu lato	54
Slika 13:	Zemljevid raporeditve filogeografskih skupin za takson <i>A. pallipes</i> sensu lato v Sloveniji	55
Slika 14:	Bayesov filogram za takson <i>A. torrentium</i> na podlagi lokusa CO1	58
Slika 15:	Bayesov filogram za takson <i>A. torrentium</i> na podlagi lokusa 16S rDNA	59
Slika 16:	Bayesov filogram za takson <i>A. torrentium</i> na podlagi lokusa ITS2	60
Slika 17:	Bayesov filogram za takson <i>A. torrentium</i> na podlagi	

	zdrženih lokusov	61
Slika 18:	Graf analize z metodo ABGD analize za sekvence CO1 za takson <i>A. torrentium</i>	63
Slika 19:	Analiza z metodo MJN za takson <i>A. torrentium</i> (lokus CO1)	66
Slika 20:	Zemljevid raporeditve filogeografskih skupin za takson <i>A. torrentium</i>	67
Slika 21:	Zemljevid raporeditve filogeografskih skupin za takson <i>A. torrentium</i> v Sloveniji	68

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Oznake vzorcev in vzorčna mesta za takson *A. pallipes* sensu lato
- Priloga B: Oznake vzorcev in vzorčna mesta za takson *A. torrentium*
- Priloga C: Oznake haplotipov za analizo MJN za takson *A. pallipes* sensu lato
- Priloga D: Oznake haplotipov za analizo MJN za takson *A. torrentium*
- Priloga E: Filogram na osnovi gena CO1 z metodo ML za takson *A. pallipes* sensu lato

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABGD	metoda za razmejitev vrst na osnovi DNA (angl. Automatic Barcode Gap Discovery)
AIC	Akaikeov informacijski kriterij (angl. Akaike information criterion)
AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (angl. amplified fragment length polymorphism)
BAN	filogeografska skupina Banovina
BI	metoda z Bayesovim statističnim pristopom (angl. Bayes inference)
bp	bazni par
CO1	regija mitohondrijskega genoma; gen za citokrom c oksidazno podenoto 1
CRAYNET	projekt »Evropski potočni raki kot ključne vrste, ki povezujejo znanost, upravljanje in ekonomijo s trajno kakovostjo okolja« (angl. Project »European crayfish as keystone species-linking science, management and economy with sustainable environmental quality«)
CSE	filogeografska skupina centralna in jugovzhodna Evropa (angl. Central and South-Eastern Europe)
CSE*	filogeografska skupina centralna in jugovzhodna Evropa (angl. Central and South-Eastern Europe), ki vključuje specifične haplotipe (Kladanj_BiH, LimR(CG, TaraR(CG CSE_2)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNA barcoding	metoda črtnih kod DNA; omogoča identifikacijo entitet glede na podobnost sekvenč
ESC	evolucijski vrstni koncept (angl. Evolutionary species concept), ki vrsto opredeljuje kot linijo, ki evoluira ločeno od takšnih skupin in ki ima lastno in edinstveno evolucijsko vlogo ter tendence
ESUs	evolucijsko pomembne enote (angl. evolutionary significant Units)
F81	Felsensteinov (1981) model nukleotidne substitucije

GTR	splošni časovno reverzibilni model nukleotidne substitucije (angl. General Time Reversible), ki predvideva šest različnih stopenj za kodonska mesta, razlikuje med tranzicijam in transverzijami ter upošteva še številne druge spremenljivke
HKY	Hasegawa Kishino Yano model nukleotidne substitucije
ITS2	jedrni lokus v regiji za ribosomske DNA (angl. Internal Transcribed Spacer 2)
IUCN	Svetovna zveza za varstvo narave (angl. International Union for Conservation of Nature)
JC	eno-parametrični model (Jukes–Cantorjev model), ki predpostavlja, da so vse nukleotidne spremembe (tranzicije in transverzije) enako verjetne
K2P	Kimura 2-parametrični evolucijski model (imenovan tudi K80), ki predpostavlja razliko med tranzicijami in transverzijami
Kolpa	filogeografska skupina Kolpa
LD	filogeografska skupina Lika in Dalmatia
LSU	jedrna velika podenota ribosoma (angl. nuclear large subunit)
MCMC	Markova veriga Monte Carlo (angl. Markov Chain Monte Carlo)
ML	metoda največjega verjetja (angl. Maximum Likelihood)
MP	metoda največje varčnosti (angl. Maximum Parsimony)
mtDNA	mitohondrijska DNA
MJN	metoda mrežnih odnosov (angl. Median Joining Network)
nDNA	jedrna DNA
NJ	metoda sosedskega združevanja (angl. neighbour joining)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
p- razdalja	genetska razdalja med pari zaporedij DNA (angl. uncorrected pairwise genetic distance), s katero opredelimo genetsko raznolikost (evolucijsko divergenco)
PSC	filogenetski vrstni koncept (angl. phylogenetic species concept), ki predstavlja vrsto kot osnovno in nedeljivo skupino organizmov, ki jo

	lahko ločimo od ostalih takšnih skupin in ki ima lasten predniško-potomskivzorec
PSHs	primarna vrstna hipoteza (angl. Primary species hypotheses) s katero določimo hipotetične vrste
PTP	metoda za razmejitve vrst, ki temelji na filogenetskem drevesu (angl. Poisson Tree Process Model)
pv	posteriorna verjetnost z metodo po Bayesovi statistiki
RNA	ribonukleinska kislina
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism)
16S rDNA	regija mitohondrijske DNA; gen, ki kodira ribosomska RNA
SB	filogeografska skupina južni Balkan (angl. South Balkans)
SNP	polimorfizem nukleotidnih mest (angl. Single Nucleotide Polymorphism)
SSU	jedrna mala podenota ribosoma (angl. nuclear small subunit)
TN93	Tamura-Nei model nukleotidne substitucije
ZPB	filogeografska skupina Žumberak, Plitvice in Bjelolasica

SLOVARČEK

Bayesov princip/metoda	metoda/princip v statistiki in verjetnosti, ki vrednoti hipoteze na podlagi posteriorne verjetnosti
kriptične vrste	vrste, ki jih morfološko ne moremo razlikovati
monofiletski	tisti, ki ima(jo) skupnega prednika
monofiletska skupina	je naravna skupina, ki vključuje skupnega prednika in vse njegove potomce
parafiletska skupina	ne vključuje vseh potomcev skupnega predika; izvorni znaki (pleziomorfije) so se pri nekaterih potomcih že spremenili in ne razkrivajo pravih odnosov med potomci
polifiletski	tisti, ki nima(jo) skupnega prednika
polifiletska skupina	ne vključuje zadnjega skupnega prednika (zdrževanje na osnovi homoplazij-konvergenca)
zunanja skupina	najbližji sorodnik skupini vrst, ki jo preučujemo (angl. outgroup)

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN CILJ RAZISKOVANJA

1.1.1 Razreševanje taksonomske nejasnosti rodu *Austropotamobius*

Osnovni problem, ki je služil kot izhodišče naše raziskave, je neenotna taksonomska členitev rodu potočnih rakov *Austropotamobius*, ki je predvsem posledica uporabe različnih metodoloških pristopov v raziskavah, pomanjkljivega vzorčenja ter neenotne uporabe vrstnih konceptov. Klasična taksonomija se je pogosto izkazala kot nezanesljiva in pomanjkljiva tudi pri sistematiki potočnih rakov (Souty-Grosset in sod., 2006). V preteklosti je bilo zaradi striktno morfološkega določanju vrst potočnih rakov storjenih veliko taksonomske napak, glavni vzrok za napake pa pripisujejo določanju vrst na osnovi obarvanosti eksoskeleta (Füreder in Machino, 2002). Kot v svoji obsežni filogenetski raziskavi, v kateri sta zaobjela potočne rake širom sveta, poročata Fetzner in Crandall (2002), pri mnogih rakih najdemo plastične in/ali konvergentne morfološke lastnosti, ki so posledica prilagajanja podobnim življenjskim razmeram. Molekularni podatki so se izkazali za natančnejše in zanesljivejše kazalce taksonomske divergence (Cracraft, 1983); tako so v začetku osemdesetih let 20. stoletja filogenetske raziskave do bile novo, molekularno razsežnost, kar predstavlja velik doprinos na področju biološke sistematike. V preteklem desetletju in pol je tudi rod *Austropotamobius* bil deležen številnih molekularnih filogenetskih raziskav, ki so veliko obetale, vendar neskladje glede taksonomske razvrstitev potočnih rakov rodu *Austropotamobius* ostaja (Grandjean in sod., 2002; Zaccara in sod., 2004; Fratini in sod., 2005; Trontelj in sod., 2005; Klobučar in sod., 2013). Grandjean in sod. (2002) so na osnovi mitohondrijske DNA (mtDNA) za klad *A. pallipes* sensu lato postavili hipotezo o obstoju dveh vrst. Po drugi strani nekateri avtorji hipotezo o dveh ločenih vrstah za takson *A. pallipes* sensu lato ne podpirajo (Trontelj in sod., 2005; Chiesa in sod., 2011). O genetsko raznolikih filetskih linijah populacij osrednjega Balkana za takson *A. torrentium* poročajo Trontelj in sod. (2005), Shubart in Huber (2006) ter Klobučar in sod. (2013).

Z raziskavo želimo pridobiti dodatne molekularne podatke, z njimi dopolniti obstoječe nabore mtDNA zaporedij obeh tradicionalnih vrst rodu *Austropotamobius* ter zaobjeti celotno območje razširjenosti rodu *Austropotamobius*. V analize smo vključili tudi zaporedja jedrnega genoma (ITS2), ter tako pridobili pomembno, od mitohondrijskega genoma neodvisno evolucijsko informacijo. Namen naše naloge je:

- določiti število hipotetičnih vrst/podvrst oz. PSHs, pri čemer smo hipotetičen razmejitveni vzorec določili z dvema metodama za razmejitev vrst na osnovi DNA: (1) z distančno metodo ABGD (Puillandre in sod., 2012) ter metodo za razmejitev vrst, ki temelji na filogenetskem drevesu PTP (Zhang in sod., 2013), pri čemer smo uporabili odsek mitohondrijskega gena za citokrom c oksidazno podenoto 1 (CO1) ter jedrno zaporedje ITS2.
- na podlagi treh lokusov (dveh mitohondrijskih genov CO1 in 16S rDNA ter jedrnega zaporedja ITS2) izvesti filogenetske in filogeografske raziskave z metodo največjega verjetja (ML) (Felsenstein, 1981), metodo z Bayesovim statističnim pristopom (BI) (Yang in Rannala, 1997) ter metodo mrežnih odnosov (MJN) (Bandelt in sod., 1999), ter določiti filogenetski položaj linij evropskih potočnih rakov rodu *Austropotamobius*. Jedrno zaporedje ITS2 je v naši raziskavi prvič uporabljeno za filogenetske analize rodu *Austropotamobius*. Z izzledki želimo prikazati celostno, predvsem pa jasnejšo sliko filogenije rodu *Austropotamobius*.

1.1.2 Prispevek k naravovarstvu

Raziskovanje biodiverzitete in njeno ohranjanje je ena glavnih nalog človeštva (Hoban in Vernesi, 2012). Z naravovarstvenega vidika, nejasnosti v taksonomiji otežujejo načrtovanje varstvenih strategij in upravljanje ogroženih vrst. Pomemben korak v varstveni biologiji, ki je veliko doprinesel k izboljšanju načrtovanja in izvajanja varstvenih ukrepov zavarovanih in potencialno ogroženih vrst, je proučevanje genetske raznolikosti populacij ter filogeografije (Frankel in Soulé, 1981). Filogeografske raziskave omogočajo identifikacijo »Evolucijsko pomembnih enot« (ESUs) in s tem pripomorejo k lažji opredelitevi varstvenih prioritet (Moritz, 1994).

Slovenske vodotoke naseljujejo tri avtohtone vrste potočnih rakov (*Astacus astacus*, *A. pallipes* sensu lato, *A. torrentium*) in vse so zavarovane. Bedjanič (2004) ter Govedič in sod. (2006) v svojih raziskavah poročajo, da so podatki o razširjenosti in ekologiji potočnih rakov v Sloveniji nepopolni, prav tako so pomanjkljivi podatki o hipotetičnih filetskih linijah. Trontelj in sod. (2005) v svoji raziskavi sicer poročajo o CO1 haplotipskih skupinah tako za klad *A. pallipes* sensu lato kot za klad *A. torrentium*, v naši raziskavi pa želimo te izsledke dopolniti in razširiti ter s tem prispevati k uspešnejšemu oblikovanju in izvajanju varstvenih praks.

1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

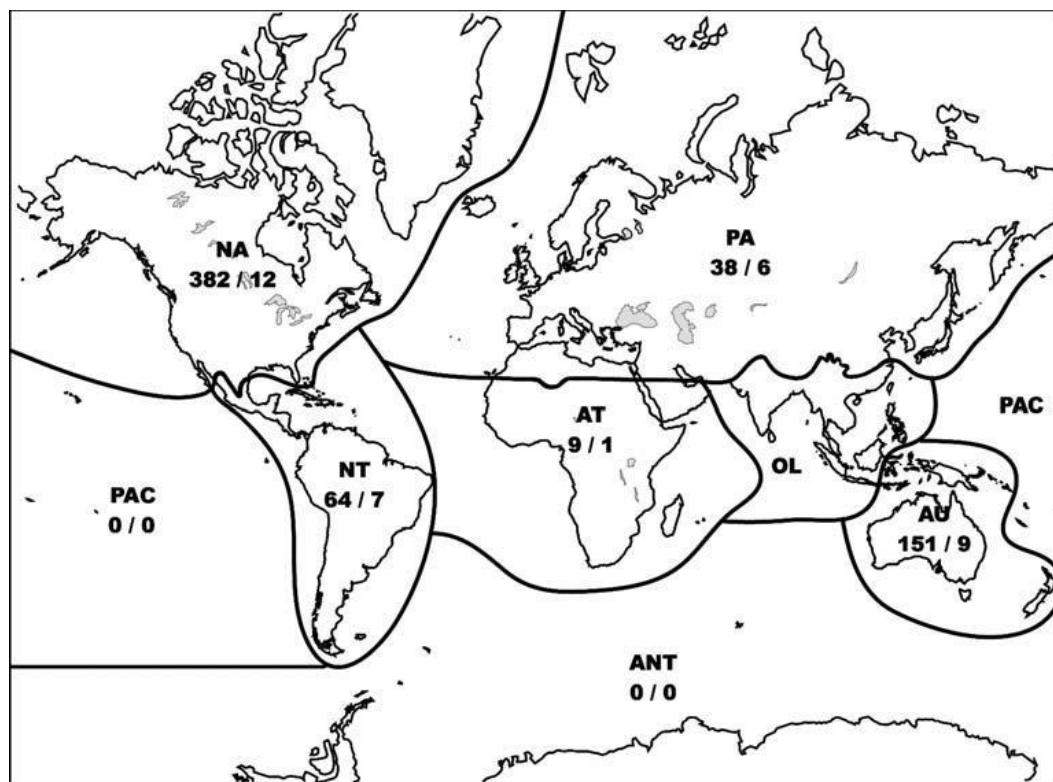
Z opravljenimi raziskavami bomo preverjali naslednje hipoteze:

1. Rod potočnih rakov *Austropotamobius* zastopata več kot dve vrsti.
2. Takson *A. pallipes* sensu lato je kompleks dveh vrst.
3. Južne populacije taksona *A. torrentium* imajo visoko genetsko raznolikost in predstavljajo avtonomne filetske linije.
4. Slovenske populacije koščenca *A. pallipes* sensu lato ter koščaka *A. torrentium* so avtohtone ter pripadajo geografsko reprezentativnim linijam za to območje.

2 PREGLED OBJAV

2.1 POTOČNI RAKI (DECAPODA: ASTACIDEA) – RAZŠIRJENOST IN DIVERZITETA

Potočni raki, največji aktivni sladkovodni nevretenčarji, tvorijo raznoliko skupino členonožcev z okoli 650 opisanimi vrstami (Slika1, Crandall in Buhay, 2008) ter igrajo pomembno vlogo v ekologiji in biodiverziteti sladkovodnih ekosistemov. Naravno so prisotni na vseh kontinentih sveta, z izjemo Afrike (najdemo jih na Madagaskarju) in Antarktike ter subkontinenta Indije (najdemo pa fosile tudi na teh kontinentih). Severna Amerika (z najbolj številčno družino Cambaridae s 409 opisanimi vrstami, od teh jih 80% najdemo na severovzhodu Združenih držav Amerike) in Avstralija (z družino Parastacidae, kjer je opisanih 152 vrst) veljata za dva centra največje raznolikosti deseteronožcev (Souty-Grosset in sod., 2006).



Slika 1. Raznolikost sladkovodnih rakov (št. vrst/št. rodov) (Crandall in Buhay, 2008: 298).

Figure 1. Biogeography of Crayfish (N. of species/N. of genus) (Crandall in Buhay, 2008: 298).

Razpon telesne velikosti te morfološko pestre skupine sega od pritlikavega raka vrste *Cambarellus sp.* (kjer odrasli osebki merijo v dolžino samo 2 cm), do največjega sladkovodnega nevretenčarja na svetu, ogrožene vrste *Astacopsis gouldii*, ki lahko doseže velikost 40 cm in tehta do 5 kg (Crandall in Buhay, 2008). Eksoskeleti različnih vrst potočnih rakov so najrazličnejših barv – od rjave, rdeče, modre, oranžne, zelene, bele, pri čemer jim zunanjost lahko dodatno krasijo pike, proge ter najrazličnejši vzorci. Vzroki za veliko morfološko pestrost skupine so vezani na specifiko in raznolikost vodnih ekosistemov, ki jih posamezne vrste naseljujejo, paleobiogeografijo posamičnih filetskih linij in specifičnih pojavov v evolucijski zgodovini. Zaradi te raznolikosti, njihove pomembnosti v biocenozi vodnih ekosistemov ter precej enostavnega zbiranja, so vrste sladkovodnih rakov vrsto let služile (in še zmeraj služijo) kot modelni organizem v različnih znanstvenih področjih. Pred več kot stoletjem je celo Huxley (1880) pripravil uvodno besedilo v zoologijo osnovano samo na proučevanju potočnih rakov.

2.2 FILOGENIJA POTOČNIH RAKOV

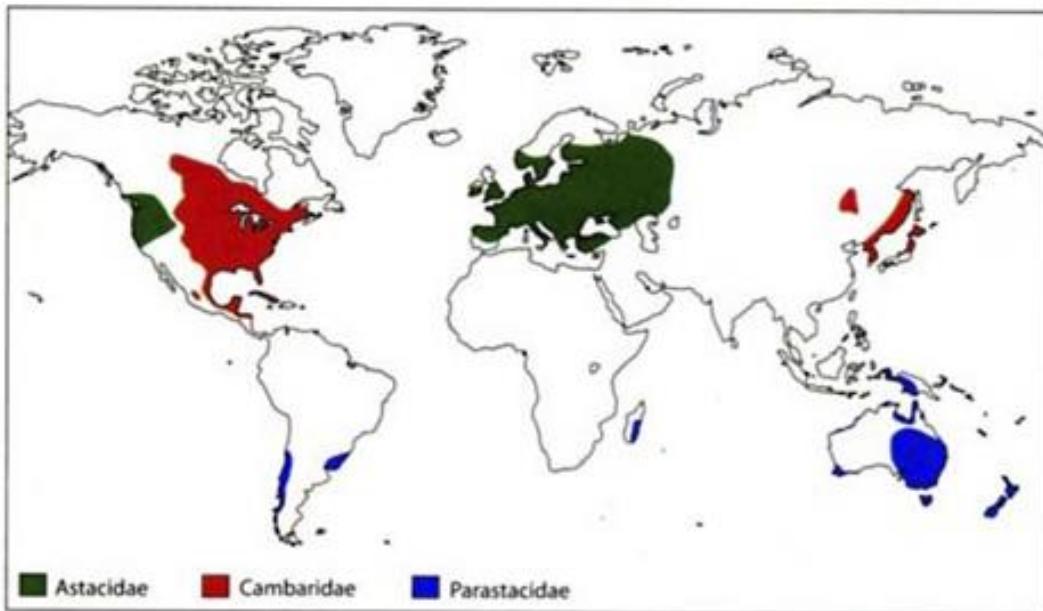
Potočni raki so starodavna bitja; najstarejši fosilni ostanki (stari 265 milijonov let), ki so jih našli na Antarktiki, pričajo o obstoju teh organizmov iz obdobja perma pred 300-250 milijoni leti, ko so se razvili iz morskih prednikov (Martin in Davis, 2001). Huxley je 1880 postavil hipotezo o difiletskem izvoru astakoidov in parastakoidov iz morskih prednikov, v kateri je predlagal, da sta ti dve skupini deseteronožcev neodvisno zavzeli sladkovodne habitate. Alternativo tej hipotezi, torej monofiletski izvor potočnih rakov in sestrski odnos naddružin Astacoidea in Parastacoidea, je 1902 predlagal Ortmann, kar so podprtli z ultrastrukturo spermijev (Jamieson, 1991), emriologijo (Scholtz, 1993) in molekularnimi filogenetskimi analizami (Crandall, 2000, 2006). Ker so fosilni ostanki zelo redki, predstavljam samo omejeno frakcijo potencialne biocenoze za določeno porečje v določenem geološkem obdobju. Težavna je tudi ocenitev vpliva paleo-geo-klimatskih dogodkov na favno in floro: dejstvo je, da spremembe v okolju predstavljajo seleksijsko sito v evoluciji življenja, vendar je izjemno težko oceniti dejanski vpliv preteklih geoloških dogodkov na evolucijske procese. Nekateri raziskovalci so mnenja,

da so hidrogeografske spremembe v obdobju pred pleistocenom (geotektonski procesi, kot so alpidska orogeneza ter izsušitev Sredozemskega morja proti koncu miocena) imele bistven vpliv na današnjo razporeditev sladkovodnih organizmov (Verovnik in sod., 2005), medtem ko drugi zagovarjajo možnost, da so ledene dobe v pleistocenu »zamaskirale« starejše paleogeološke dogodke (Banarescu, 2004; Hewitt, 1999; Souty-Grosset in sod., 2006). Kakorkoli, avtorji se strinjajo, da je Balkan, s svojo specifično paleogeološko zgodovino, imel pomembno vlogo glacialnega zatočišča in predstavlja vročo točko biodiverzitete evropske favne (Gaston in David, 1994; Hewitt, 1999; Griffiths in sod., 2004).

Zelo poenostavljena evolucijska zgodovina potočnih rakov (Astacidea, Latreille, 1802): izvor potočnih rakov sega v obdobje poznega perma/zgodnjega triasa (fosili izpred 265 milijonov let), ko je prakontinent Pangea bil še nečlenjen; v tem obdobju so se potočni raki ločili od morskih prednikov (Crandall in sod., 2000, 2006; Dixon in sod., 2003). V obdobju jure (200-140 milijoni let), ko sta se izoblikovala severni kontinent Lavrazija in južni kontinent Gondvana, so razlike v favni in flori obeh kontinentov začele postajati vse večje. V tem obdobju sta se izoblikovali obe (geografsko lepo ločeni) naddružini potočnih rakov (Slika 2):

1. naddružina Parastacoidea – z družino Parastacidae, katerih predstavniki poseljujejo južno zemeljsko poloblo;
2. naddružina Astacoidea – z dvema družinama Astacidae in Cambaridae, katerih predstavniki poseljujejo severno zemeljsko poloblo.

Nadružinama Parastacoidea in Astacoidea pripisujejo sestrski odnos z naddružino morskih rakov Nephropoidea (Crandall in sod., 2000).



Slika 2: Razporeditev družin potočnih rakov (Souty-Grosset in sod., 2006: 12).

Figure 2: Present distribution of cryfish families (Souty-Grosset et al., 2006: 12).

Hipotetičen center izvora astakoidov predstavlja področje vzhodne Azije, kjer so na območju današnje Kitajske in Mongolije našli najstarejše fosile te naddružine (iz obdobja pozne jure in zgodnje krede). Souty-Grosset in sod. (2006) so mnenja, da naj bi predniki družine Cambaridae po Beringovem kontinentalnem mostu potovali na vzhod (do območja današnje Severne Amerike in Mehike), medtem ko naj bi predniki družine Astacidae iz vzhodne Azije potovali proti zahodu ob južni obali Tetijskega morja do ozemlja današnje Evrope. Monofiletki izvor družin Astacidae in Cambaridae nekateri avtorji podpirajo (Martin in Davis, 2001), drugi zaradi pomanjkanja podatkov in povezanosti rodu *Cambaroides* z družino Astacidae omenjenima družinama pripisujejo parafiletski izvor (Crandall in sod., 2000; Scholtz, 2002). Fosile astacidov iz obdobja zgodnje krede so našli na jugu centralne Nemčije (rod *Austropotamobius*), iz obdobja paleocen v Franciji iz pliocena v severni Ameriki in Rusiji in iz pleistocena širom Evrope.

Današnja razporeditev evropskih sladkovodnih rakov, ki jih taksonomsko uvrščamo v eno družino Astacidae, je posledica naravnih geo-klimatskih dogodkov v preteklosti, kot tudi antropogenih posegov (neposredno prenašanjem vrst za gojenje in spremištanje naravnega

okolja – gradnja kanalov, melioracije, regulacije rečnih strug, onesnaževanje voda s komunalnimi in industrijskimi odplakami, pesticidi, kmetijskimi gnojili ...), kar je imelo precejšen vpliv na razporeditev vrst in populacijsko sestavo evropskih potočnih rakov (Vigneux in sod., 1993).

V evropskih sladkovodnih ekosistemih sta avtohtonata dva rodova potočnih rakov (Souty-Grosset in sod., 2006):

1. rod *Astacus* (Fabricius, 1775), ki ga zastopajo trije taksoni: *Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus*, *Astacus pachypus*), ter
2. rod *Austropotamobius* (Skorikov, 1907), zastopan z dvema tradicionalnima taksonoma: *Austropotamobius pallipes* sensu lato (vrstni kompleks) in *Austropotamobius torrentium*.

Poleg petih avtohtonih vrst potočnih rakov evropske vodotoke naseljuje vsaj 9 vrst alohtonih vrst potočnih rakov: *Pacifastacus leniusculus*, *Orconectes immunis*, *Orconectes limosus*, *Orconectes virilis*, *Orconectes rusticus*, *Cherax destructor*, *Cherax quadricarinatus*, *Procambarus clarkii*, *Procambarus sp.* (Souty-Grosset in sod., 2006). Dejstvo je, da z vnosom tujerodnih vrst v naravne ekosisteme rušimo ravnovesje celovitih ekosistemov, s čimer ogrožamo domorodne vrste, lahko pa le-te tudi izumrejo (Jiggins in Mallet, 2000). Varovanje potočnih rakov, kot komponento biološke raznolikosti, je koristno kot splošno varovanje vodnih virov in okolij. V Evropi je leta 2002 bil zasnovan projekt »Evropski potočni raki kot ključne vrste, ki povezujejo znanost, upravljanje in ekonomijo z trajno kakovostjo okolja« (CRAYNET), ki zagotavlja bazo znanja za naravovarstveno strateško upravljanje avtohtonih vrst evropskih potočnih rakov (Souty-Grosset in sod., 2006). V zahodni Evropi sta taksona *A. pallipes* in *A. torrentium* zavarovana. Takson *A. pallipes* je uvrščen na rdeči seznam Svetovne zveze za varstvo narave (IUCN Red List) in v Annex II in V Evropske okoljske direktive (angl. EU Habitats Directive 92/43/EEC in 97/62/EU), takson *A. torrentium* v Appendixu III Bernske konvencije in Appendixu II in V Evropske okoljske direktive (angl. EU Habitats Directive 92/43/EEC in 97/62/EU). V Sloveniji sta koščenec *A. pallipes* in koščak *A. torrentium* kot ranljivi vrsti uvrščena v Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam (Ur.l.

82/2002), zavarovana pa na podlagi Zakona o ohranjanju narave ter z Uredbo o zavarovanih prosto živečih živalskih vrstah (Ur.l. RS 46/2004, 109/2004, 84/2005, 115/2007) in uvrščena v njeni prilogi 1A in 2A (varstvo domorodne vrste in varstvo habitata).

Potočni raki so bili nekoč razširjeni po vsej Sloveniji. Človek je s svojimi posegi v naravne ekosisteme prinesel posledice, kot so tekmovanje med domorodnimi in tujerodnimi vrstami za življenski prostor in hrano, obolenje, ... kar je prispevalo k izginjanju domorodnih vrst potočnih rakov tudi pri nas. Zaradi rače kuge (povzroča jo gliva *Aphanomyces astaci*, ki je v evropske vodotoke prišla z umetnim naseljevanjem tujerodnih severnoameriških vrst potočnih rakov), regulacij in onesnaževanja voda pa so izginili iz marsikaterega vodotoka ter veljajo za zelo redke. Nekoč so v Sloveniji imeli tudi gospodarski pomen (prehrambena industrija), danes pa je njihov pomen predvsem naravovarstven. V Sloveniji so zavarovane vse tri avtohtone vrste (jelševec *Astacus astacus*, koščak *Austropotamobius torrentium* in koščenec *Austropotamobius pallipes*), za delo z njimi in raziskovanje pa je potrebno dovoljenje. Z vstopom Slovenije v Evropsko unijo so bila za oba taksona rodu *Austropotamobius* razglašena posebna varstvena območja Natura 2000 (Govedič, 2006).

2.3 ROD *Austropotamobius* IN TAKSONOMSKA PROBLEMATIKA

Rod *Austropotamobius* Skorikov (1907) je monofiletski rod potočnih rakov znotraj družine Astacidae (Scholtz in Richter, 1995; Crandall in sod., 2000; Scholtz, 2001), ki naseljuje evropske vodotoke vse od Pirenejskega polotoka na jugozahodu in Britanskega otočja na severozahodu, preko centralne Evrope do Italije na jugu ter Balkanskega polotoka na jugovzhodu (Machino in Holdich, 2006). Številnim taksonomskim opredelitvam na osnovi morfoloških znakov (Bott, 1950; Karaman 1962; Brodskij, 1983) so od devetdesetih let 20. stoletja naprej sledile molekularne raziskave; prve so bile izvedene na alocimih (Albrecht, 1982; Nascetti in sod., 1997; Santucci in sod., 1997; Largiader in sod., 2000), nato pa še na osnovi mitohondrijskih in jedrnih DNA zaporedij: RFLP (Grandjean in sod., 1998; Largiader in sod., 2000), mitohondrijskega gena 16S rDNA (Grandjean in sod., 2000a, b; Barič in sod., 2005; Zaccara in sod., 2004; Fratini in sod., 2005; Ghia in sod., 2006;

Cataudella in sod., 2006), mitohondrijskega gena CO1 (Dieguez-Urbiendo in sod., 2005; Trontelj in sod., 2005; Stefani in sod., 2009; Pedraza-Lara in sod., 2010; Matallanas in sod., 2011) ter kombiniranih študij dveh ali treh genetskih označevalcev: CO1 in 16S rDNA (Schubart in Huber, 2006; Klobučar in sod., 2013); 16S rDNA in CO1 in mikrosateliti (Barič in sod., 2005); CO1 in AFLP (Chiesa in sod., 2011); CO1 in 16S rDNA in RFLP (Scalici in sod., 2011); CO1 in 16S rRNA in mikrosateliti (Matallanas in sod., 2012). Kljub številnim filogenetskim raziskavam sistematika rodu *Austropotamobius* še zmeraj ni razrešena, taksonomsko sta priznana dva kladova: *A. pallipes* sensu lato (koščenec) in *A. torrentium* (koščak) (Souty-Grosset in sod., 2006). Rezultati novejših molekularnih raziskav nakazujejo na veliko genetsko raznolikost znotraj obeh kladov, v raziskavah je opisanih več filetskih linij, nekaterim pripisujejo vrstni status. Takson *A. pallipes* je zaradi nejasnih in prikritih diverzifikacijskih vzorcev upravičeno dobil oznako kompleks vrst. Po najnovejših molekularnih filogenetskih raziskavah naj bi tudi takson *A. torrentium* predstavljal kompleks potencialnih kriptičnih vrst (Klobučar in sod., 2013). Za razjasnitev filogenetskih odnosov obeh taksonov so potrebne dodatne raziskave, kar je bil tudi namen tega dela.

Souty-Grosset in sod. (2006) evolucijsko zgodovino rodu *Austropotamobius* strnjeno opisujejo sledeče: hipotetično rod *Austropotamobius* izvira iz področja Balkanskega polotoka, natančneje iz Istre. V miocenu, ko je Jadranska plošča razdelila Paratetis od paleomediteranskega morja, naj bi prišlo do ločitve populacij na panonsko in jadransko, kar naj bi vodilo do speciacije in formiranja dveh linij *A. torrentium* (panonsko območje) in *A. pallipes* (jadransko območje) (Dercourt in sod., 1986). Kot dokaz navajajo kompleksne biogeografske in filogenetske vzorce populacij iz Italije in Istre za takson *A. pallipes*, ter populacij iz južnega Balkanskega polotoka za takson *A. torrentium*. Iz severnega jadranskega porečja je ena linija *A. pallipes* doseгла Francijo in se nato širila v Švico in jugo-zahodni del Nemčije. Druga linija se je po Balkanskem polotoku širila vse do reke Zeta v Črni Gori. Kladu *A. pallipes* ni uspelo kolonizirati Donave, dokler ga vanjo ni naselil človek (Avstrija). Klad *A. torrentium* naj bi iz juga Balkanskega polotoka koloniziral centralno Evropo (Souty-Grosset in sod., 2006).

2.3.1 Filogeografija vrst iz rodu *Austropotamobius*

Tradicionalna sestrskata taksona *A. pallipes* in *A. torrentium* sta prešla podobne serije zgodovinskih geo-klimatskih dogodkov, ki so vplivali na gensko strukturo in biogeografijo njunih populacij. Tako imata oba taksona visoko nukleotidno pestrost (π) na jugu Evrope – v primeru koščenca *A. pallipes* so te skupine prisotne na geografsko majhnih območjih Istrskega polotoka, medtem ko so genetsko najrazličnejše populacije *A. torrentium* na jugu Balkanskega polotoka (Trontelj in sod., 2005; Klobučar in sod., 2013). Tudi alpske populacije obeh vrst so haplotipsko bogate, vendar veliko manj kot tiste na južnih območjih Evrope (Largiader in sod., 2000; Trontelj in sod., 2005). Po drugi strani so vse populacije koščenca in koščaka severno in zahodno od Alp genetsko uniformne (Trontelj in sod., 2005; Schubart in Huber, 2006). Ta genetsko-populacijski vzorec hipotetično nakazuje »ostanke« preživelih populacij potočnih rakov po ledenih dobah na jugu Evrope (Balkan) in poledenodobno kolonizacijo severnih območij Evrope.

2.3.2 Klad *Austropotamobius pallipes*

Klad *A. pallipes* sensu lato (Lereboullet, 1858) naseljuje raznolike vodne habitate od hitro tekočih rek do počasi tekočih voda (kanali, ribniki, jezera) zahodne, centralne in južne Evrope (Souty-Grosset in sod., 2006; Kouba in sod., 2014). Po dosedanjih podatkih je najden v 18 evropskih državah (Kouba in sod., 2014). Kot poročajo v raziskavi Machino in sod. (2004), naj bi takson *Austropotamobius pallipes* v preteklem stoletju umetno naselili v vode Portugalske, Španije, Irske, Škotske, Liechtensteina in Avstrije. Prisoten je v nižinskih kot tudi visokogorskih rekah Alp (do nadmorske višine 1400 m) in Španije (do nadmorske višine 1500 m) in ima relativno široko valenco na fizikalno-kemijske pogoje vode, predvsem na temperaturo vode (od 10 do 24 °C) in vsebnosti kisika, vendar mora voda vsebovati zadostno količino kalcija. Njihov idealen habitat so čiste vode z malo sedimenta, z zatočišči iz kamnov, drevesnih korenin, votlin in rogov. Včasih je veljal za dobrega indikatorja čiste vode, vendar je danes znano, da relativno dobro prenaša tudi evtrofifikacijo in zakisanje voda, občutljiv pa je za pesticide. Prav tako je občutljiv na

pogozdovanje z iglavci, kar so opazili v Franciji, kjer je zaradi tega skoraj izginil iz rek Lorraine in Garonne (Souty-Grosset in sod., 2006). Je vsejed, prehranjuje se predvsem z algami in ostalim vodnim rastlinjem, odmrlo vegetacijo, ličinkami žuželk, ikrami, mrtvimi ribami. Osebki lahko živijo 10 let in več. Morfološke značilnosti odraslega osebka so predstavljene v Preglednici 1.

Preglednica 1: Morfološka karakterizacija za rod *Austropotamobius* (Govedič, 2006; Souty-Grosset in sod., 2006).

Table 1: Morphological characterisation for genus *Austropotamobius* (Govedič, 2006; Souty-Grosset in sod., 2006).

KRITERIJ/VRSTA	<i>A. pallipes</i> sensu lato	<i>A. torrentium</i>
Rostrum	Širok, trikoten ali trapezoiden	Trikoten
Trni rostruma	Prisotni	Prisotni, redki
Osrednji greben rostruma	Viden po celi dolžini rostruma in brez trnov	Neizrazit; odvisno od populacije je greben lahko odsoten, rahlo viden ali dobro razvit (populacije iz porečja zgornje Kolpe)
Velikost in površina škarij	Velike in ozke, površina drobnozrnata	Velike in široke, površina zelo groba in z velikimi zrni
Vdolbina na notranjem robu nepremične škarje	Ni prisotna	Zelo izražena
Vratna brazda	Trnasta	Brez trnov
Postorbitalni trni	En par postorbitalnih trnov jasno viden, drugi par redko viden	En par jasno viden
Antene	Baza antene ni nazobčena	Ventralni greben na antenah z vrsto trnov, ki dajejo žagasto-zobati izgled (unikaten taksonomski znak za <i>A. torrentium</i>)
Drugi par moških pleopodov s talonom	Da	Da (populacije iz Turčije, Slovaške, južna Avstrije); ne (populacije severne Avstrije do Luksemburga);
Barva karapaksa in škarij	Olivno-rjava ali rjava, lahko tudi črna, belkasto siva ali bež; okončine so včasih lahko svetlejše kot telo; spodnja stran škarij je gladka in običajno umazano bele barve, lahko pa tudi rožnata, zelena, modra ali oranžna, nikoli pa rdeča ali iste barve kot telo	Rjava, olivno zelena, bež ali svetlo rjava, lahko tudi oranžna; spodnja stran škarij rahlo obarvana, večino bež, rožnato ali svetlo oranžna, nikoli pa rdeča ali umazano rjava
Velikost	Do 14 cm	Do 12 cm, običajno manj kot 10 cm

2.3.2.1 Taksonomija taksona *A. pallipes* sensu lato

Takson *A. pallipes* sensu lato je, kljub številnim študijam in razpravam, že več desetletij predmet sistematske neenotnosti. Bott (1950) je takson na osnovi morfoloških znakov razvrstil v dve ločeni vrsti (*A. pallipes*, *A. berndhauseri*), dve vrsti (*A. pallipes*, *A. italicus*) sta ločila tudi Karaman (1963) in Brodskij (1983), medtem ko ga je Albrecht (1982) opredelil kot eno vrsto s štirimi podvrstami. Kljub mnogim molekularnim filogenetskim raziskavam v zadnjih treh desetletjih ostaja taksonomija klada nerazrešena, število hipotetičnih vrst in podvrst se razlikuje glede na uporabljene genske označevalce ter interpretacijo filogenetskih dreves in vrstnega koncepta. Njegov trenuten taksonomski položaj večina avtorjev označuje kot kompleks vrst *A. pallipes* sensu lato (Largiader in sod., 2000; Holdich in sod., 2006; Souty-Grosset in sod., 2006; Chiesa in sod., 2011). Raziskave so pokazale, da ima takson močno genetsko strukturo ter veliko genetsko raznolikost znotraj in med različnimi populacijami. Nekateri avtorji podpirajo hipotezo o genetsko ločenih kladih (v rangu vrste) *A. pallipes* in *A. italicus*, z dokaj značilno biogeografijo: klad *A. pallipes* je prisoten v vodotokih severozahodne Italije, Francije, južne Nemčije ter državah britanskega otočja in klad *A. italicus* v Italiji, Španiji, Švici, Avstriji in državah Balkanskega polotoka (Souty-Grosset in sod., 2006). Simpatične populacije obeh hipotetičnih sestrskih vrst (obe kladov) najdemo v porečju reke Pad v pokrajini Piedmont na severu Italije (Santucci in sod., 1997; Zaccara in sod., 2004). Nascetti in sod. (1997), Santucci in sod. (1997) ter Zaccara in sod. (2004) so v svojih študijah izključili hipotetično prisotnost hibridov na tem območju. Prav tako neenotna so mnenja o številu podvrst: v zvezi s hipotetično vrsto *A. italicus* so predlagali hipotezo o obstoju treh podvrst *A. i. italicus*, *A. i. carsicus*, *A. i. carinthiacus* (Grandjean in sod., 2002; Barič in sod., 2005) ter hipotezo o štirih podvrstah (omenjenim trem je dodan *A. i. meridionalis*) (Zaccara in sod., 2004; Dieguez-Uribeondo in sod., 2005; Fratini in sod., 2005; Cataudella in sod., 2006; Ghia in sod., 2006). V zvezi s kladom *A. pallipes* sensu stricto sta bili predlagani dve podvrsti: *A. p. pallipes* (Francija, britansko otočje in Nemčija) in *A. p. subsp. nov.* v Liguriji (Italija) in Alpes Maritimes (Francija) (Souty-Grosset in sod., 2006). Na drugi strani ostajajo nekateri avtorji bolj previdni; tako Trontelj

in sod. (2005), Gouin in sod. (2003), Chiesa in sod. (2011) ter Scalici in sod. (2011) z rezultati filogenetskih raziskavah hipoteze o dveh ločenih vrstah ne podpirajo.

2.3.3 Klad *Austropotamobius torrentium*

Najmanjšega predstavnika evropskih avtohtonih vrst potočnih rakov *A. torrentium* (Schrank, 1803) najdemo v vodotokih centralne Evrope, vključno z Grčijo in Bolgarijo na jugu. Naseljuje manjše tekoče vodne habitate s kameno podlago, kjer je dovolj – predvsem kamenih – zavetišč, kot so potoki in manjše reke predvsem v hribovitem svetu. Večina rek, ki jih naseljujejo, ima širino manj kot 2 m (Bohl, 1987), zelo redko jih najdemo v rekah s premerom več kot 10 m (v zahodni Evropi reka Kammel (Bavarska) in Archbach (Tirolska)) (Füreder in Machino, 1996). Če je vpliv človeka na vodni ekosistem majhen, ga lahko najdemo tudi v večjih rekah, kot je reka Lim v Črni Gori s širino več kot 40 m. V večjih rekah prebiva blizu obrežja. V Bolgariji so ga našli na nadmorski višini 1700 m (Machino in Füreder, 1998). Slabše tolerira visoke temperature vode (od 8 °C do 23 °C, optimalna temperatura voda je od 14 do 18 °C) in nizek nivo kisika v vodah kot druge vrste potočnih rakov in velja za najbolj občutljivo vrsto avtohtonih evropskih potočnih rakov na onesnaževanje voda; praktično ga ne najdemo v topnih in onesnaženih vodah, kot tudi ne v stagnirajočih in blatnih vodah. Senčni vodni habitati, kjer korenine in veje nudijo zatočišča, so dobrodošli. Večina populacij je majhnih in izoliranih. Lahko bivajo v vodah s postrvimi (*Salmo trutta f. fario*), glavači (*Cottus gobio*), navadnimi globočki (*Gobio gobio*) in pisanci (*Phoxinus phoxinus*), čeprav v večini njihovih naravnih habitatov ne najdemo rib. Je vsejed, prehranjuje se predvsem z algami in ostalim vodnim rastlinjem, odmrlo vegetacijo, ličinkami žuželk, ikrami, mrtvimi ribami. Živijo lahko 10 let in več. Morfološke značilnosti odraslega osebka so navedene v Preglednici 1.

2.3.3.1 Taksonomija taksona *A. torrentium*

V primerjavi s sestrsko vrsto *A. pallipes* sensu lato je takson *A. torrentium* na področju taksonomije in filogenije veliko manj raziskan. Karaman (1929, 1962) ga je na osnovi morfoloških kriterijev razdelil v tri podvrste: *A. t. torrentium* (Luksemburg, Nemčija, Švica, severna Avstrija in Češka), *A. t. macedonicus* (Črna Gora (jezero Skadar s porečji), Srbija (porečja reke Drine in reke Vardar), Albanija, Makedonija in Grčija), *A. t. danubicus* (južna Avstrija, Slovaška, Češka, Madžarska, Italija, Slovenija, Hrvaška, Bosna in Hercegovina, Romunija, Srbija, Črna Gora (porečje Donave), Bolgarija in Turčija). Po poročanjih Souty-Grosset in sod. (2006) naj bi bil v Luksemburg in na Češko umetno prenesen. Novejše molekularno sistematske raziskave so pokazale, da tradicionalna vrsta *A. torrentium* predstavlja kompleks morfološko kriptičnih, a molekularno raznolikih vrst (Trontelj in sod., 2005; Schubart in Huber, 2006; Klobučar in sod., 2013). Trontelj in sod. (2005) v raziskavi na osnovi gena CO1 poročajo o dveh jasno ločenih filogeografskih entitetah, eni v porečju zgornje Kolpe na slovensko-hrvaški meji, in drugi, ki obsega populacije južnega Balkana, JV Alp, Slovenije in zgornjega porečja reke Ren. Schubart in Huber (2006) poročata o genetski homogenosti nemških populacij *A. torrentium* iz reke Donave in reke Ren. V najnovejši obsežni študiji filogenije in filogeografije na osnovi dveh mitohondrijskih genov 16S in CO1 (Klobučar in sod., 2013) poročajo o obstoju sedmih filetskih skupin znotraj vrste *A. torrentium*. Pet identificiranih filetskih entitet iz severo-centralnih Dinaridov (Gorski Kotar - GK, Zeleni Vir – ZV, Lika in Dalmatia – LD, Žumberak, Plitvice in Bjelolasica – ŽPB, Banovina – BAN) opredeljujejo kot hipotetične kriptične vrste.

2.4 OSNOVE EVOLUCIJSKE BIOLOGIJE IN MOLEKULARNA FILOGENETIKA

Evolucija kot biološki pojav s svojimi procesi in zakonitostmi poraja življenje v vsej svoji pestrosti in veličini (Mayr, 2008). Skozi čas si je človek razlagal življenje, njegov izvor in namen na različne načine, običajno v skladu s takratnimi nazorji in prepričanji. Prvo evolucijsko teorijo sta 1859 ločeno predstavila Darwin in Wallace. Sledila so nova odkritja s pomembni prispevki: Weissmann, Mendel, S. Wright, J. B. S. Haldan in R. A. Fisher,

Hardy in Weinberg, Watson in Crick; vsa ta odkritja so prispevala k oblikovanju sodobne sinteze neodarvinizma (Mayr, 2008). Spekter pogledov na evolucijo je tako pester kot evolucija sama: lahko je popolnoma reduktionističen, kjer je tarča naravnega izbora gen (Dawkins, 1976) in ne več organizem, lahko pa genetski razsežnosti evolucije dodamo več dimenzij – epigenetsko, vedenjsko in simbolno, kot sta to v svojem delu predstavili Jablonka in Lamb (2009).

Evolucijska biologija je področje biologije, ki preučuje skupen izvor bioloških vrst in njihovo spreminjaњe, razširjanje ter raznovrstnost v času. Darwin (1859) je postuliral štiri predpostavke evolucije: (1) spremenljivost, (2) razmnoževanje, (3) dednost, (4) tekmovanje. Če obstajajo vsi pogoji, je evolucija z naravnim izborom neizogibna (Jablonka in Lamb, 2009). Kot je dejal Mayr (2008) je dejansko prizorišče evolucije populacija, vir variacij in tako tarča naravnega izbora pa posameznik. Po neodarvinistični teoriji vplivajo na gensko sestavo in procese v bioloških populacijah štiri evolucijske sile: naravni izbor (selekcija), naključni genski drs, mutacije in migracije (kar proučuje populacijska genetika). Z delovanjem teh mehanizmov se mutacije fiksirajo in organizmi se z njihovim kopijenjem sčasoma spreminjajo in ta proces lahko vodi v nastanek novih vrst (Gould, 2002). Leta 1965 sta Zuckerkandl in Pauling evolucijo časovno kalibrirala – predstavila sta »molekularno uro«, kjer "tik" v času predstavlja mutacija. Kot sta ugotovila, molekularni čas teče dokaj linearno (medtem ko morfološka evolucija teče precej manj enakomerno in manj povezano). Tako lahko, če poznamo stopnjo hitrosti in število mutacijskih "tikov", določimo, koliko časa sta vrsti ločeni ena od druge. Znano je, da se hitrost molekularne ure razlikuje med različnimi geni (odseki DNA) in različnimi vrstami/skupinami organizmov. Posledično je za razreševanje evolucijskih vprašanj (filogenetika, populacijska genetika) ključen izbor primerenega odseka DNA. Za primerjavo bližnje sorodnih skupin (sorodne vrste, populacije iste vrste) so primerni odseki DNA, v katerih se spremembe kopijo hitreje, medtem ko se za razreševanje globokih filogenij uporablajo bolj ohranjeni odseki, v katerih se spremembe kopijo počasneje. V filogenetskih študijah so se najbolje izkazali geni, povezani z univerzalnimi življenskimi procesi, kot sta na primer sinteza proteinov in celično dihanje, saj vsebujejo zadostno količino tako evolucijsko ohranjenih kot variabilnih delov v zaporedju DNA. Za ugotavljanje genske strukture populacij in odnosov med vrstami se v splošnem najpogosteje uporablajo odseki mitohondrijske DNA, od jedrnih

zaporedji pa odseki ribosomske DNA (5,8S, 28S in 18S rDNA, ter nekodirajoča intragenska regija ITS2 med genoma 5,8S in 28S rDNA), polimorfizmi nukleotidnih mest (SNP, ki predstavljajo večji del genske variabilnosti) in mikrosateliti (Hwang in Kim, 1999). Prednost mitohondrijske DNA pred jedrno je zlasti odsotnost rekombinacije, saj se pri živalih mtDNA običajno dedujejo samo po materini liniji, saj so mitohondriji semenčic (spermijev) očeta po oploditvi uničeni preko ubikvitin-označevalnega sistema (dedovanje mtDNA po očetovi strani je bilo dokazano pri školjkah, vinskih mušicah, medonosnih čebelah in škržatih rodu *Magicicada*). Spremembe genskega zapisa so tako izključno posledica vertikalno prenesenih mutacij, kar omogoča bolj jasen vpogled v sorodstvene odnose med osebki. Poleg tega je mtDNA bolj podvržena mutacijam (slabši popravljalni mehanizmi) in ima zato večjo hitrost evolucije, zaradi česar so mitohondrijski geni primernejši za ugotavljanje filogenetskih odnosov med zelo sorodnimi taksoni in so med najpogosteje uporabljenimi molekulskimi markerji v filogenetskih študijah (Avise 2000).

Vse življenje na našem planetu je združeno v zgodovini evolucije. Ime za evolucijsko zgodovino *filogenija* je skoval Ernst Haeckel. Po grobih ocenah na našem planetu trenutno obstaja 7 do 100 milijonov vrst, do sedaj jih je opisanih okoli 1,7 milijona (Costello in sod., 2012). Kar je Darwin v svojem slavnem delu *O izvoru vrst* (Darwin, 1859) podal kot eno izmed teorij evolucije, da vsi organizmi izhajajo iz istega prednika, danes potrjujejo morfološke, biokemijske in molekularne raziskave. Filogenetika (ali filogenetska sistematika) kot veda se ukvarja z rekonstrukcijo evolucijske zgodovine (filogenije) bioloških skupin. Cilja filogenetskih raziskav sta dva: rekonstrukcija »pravilnih« sorodstvenih odnosov med organizmi in ocena časa, ko je prišlo do cepitve med skupinami (divergenca). Rezultat filogenetske analize lahko grafično predstavimo s pomočjo filogenetskega drevesa, ki pa, kot poudarja Hall (2013), ni niti dejstvo niti hipoteza (slednjo namreč lahko preverimo), ampak je le ocena poteka evolucijskih dogodkov preučevanih skupin. Hall (2013) definira štiri korake, ki so nujno potrebni za uspešno izvedbo filogenetskih analiz: (1) določitev homolognih sekvenc, ki bodo vključene v filogenetsko analizo; (2) poravnava, ki je ključna, saj na njej temelji filogenetsko drevo; (3) ocena drevesa (statistična podpora vozliščem v filogenetskem drevesu); tukaj poznamo več metod (distančne in znakovne, ki so opisane v nadaljevanju); (4) ustrezni izris filogenetskega drevesa.

2.4.1 Filogenetska drevesa

Prva filogenetska drevesa so temeljila na primerjavi morfoloških značilnosti, 1967 pa sta znanstvenika Fitch in Margoliash bila prva, ki sta za izdelavo filogenetskega drevesa uporabila molekularne podatke. Filogenetsko drevo je sestavljeno iz vej (angl. branches) in vozlišč (angl. nodes). Notranja vozlišča predstavljajo (hipotetičnega) prednika, zunanjia vozlišča ali listi pa preučevane skupine, torej obstoječe taksoni. Vozlišča so med seboj povezana z vejami, slednja predstavljajo njihovo sorodstveno povezavo, dolžina vej pa poroča o količini sprememb, ki so se nabrale med predniki in potomci od njihove cepiteve (Hall, 2013). Medtem ko topologija nekoreninjenega drevesa predstavlja samo genealoške odnose med skupinami, koreninjeno drevo poleg tega prikazuje tudi zaporedje oz. hierarhijo ceptev skupin (evolucijsko pot), korenina pa (v idealnem primeru) predstavlja skupnega prednika vseh vključenih skupin. Ker pravega prednika (običajno) ne poznamo, filogenetsko drevo ukoreninimo s pomočjo zunanje skupine (angl. outgroup), za katero obstajajo zunanje informacije (npr. paleontološki podatki), da se je odcepila prej kot katera od preučevanih skupin in se ne bo uvrstila mednje. Na kratko povzeto: filogenetsko drevo je grafičen prikaz sorodstvenih odnosov med preučevanimi taksoni in njihovimi predniki in nam torej nudi hipotetičen približek poteka evolucije preučevane skupine, ali po besedah Avisea (2000): »Filogenetsko drevo je naiven poizkus preproste razlage (mutacije, genetska izolacija) za zelo kompleksen proces (speciacija)«.

Metode za izris filogenetskih dreves delimo na distančne metode in metode na osnovi znakov. Distančne metode nukleotidna zaporedja (ali morfološke zanke) pretvorijo v matriko razdalj (distančno matriko), kjer vrednosti predstavljajo količino razlik med DNA zaporedji preučevanih vzorcev. Med najpogosteje uporabljenimi distančnimi metodami je metoda sosedskega združevanja (NJ) (Saitou in Nei, 1987), ki temelji na principu združevanja parov v operacijske taksonomske enote tako, da je celotna dolžina vej na koncu združevanja enot minimalna. Začne z zvezdastim drevesom in ko najde najbližji par, ga združi v operacijsko enoto ter nadaljuje iskanje dokler ne razreši vseh medsebojnih odnosov na drevesu. Metoda NJ dopušča različne stopnje sprememb na posameznih vejah. Metode na osnovi znakov v nukleotidnem zaporedju primerjajo stanje znakov na vsaki

poziciji v poravnanim zaporedju (torej vertikalni stolpci poravnave). Na osnovi te evolucijske informacije določijo najverjetnejše sorodstvene odnose. Med temi metodami so najbolj uporabljene: metoda MP, metoda ML ter metoda BI (je različica metode ML, podprta z Bayesovo statistiko). Metoda MP, kot pove že ime, išče najbolj varčno drevo. Najprej v poravnavi poišče informativna mesta, ki dajejo prednost določenemu drevesu pred drugimi, kot najbolj verjetno drevo pa določi tisto, do katerega pride z najmanjšim številom sprememb med temi mesti (najbolj varčno drevo). Z metodo ML ocenimo verjetnost hipoteze o evolucijski zgodovini, ki jo v našem primeru predstavlja filogenetsko drevo. Algoritem pri določenem modelu in obstoječih podatkih, med vsemi možnimi drevesi izračuna tisto z največjim verjetjem (rezultat na vozlih podaja verjetnost, da bi ob danem drevesu in izbranem modelu dobili obstoječi rezultat). Podporo drevesu zagotovi s samovzorčenjem, tako da ovrednoti število ponovitev, pri katerem je bila ponujena določena rešitev filogenetskega odnosa. Metoda BI temelji na Bayesovi statistiki, najboljše drevo izriše z algoritmom Markov Chain Monte Carlo (MCMC), tako da algoritem v vsakem koraku predlaga novo drevo, ki ga izbere z naključno premestitvijo vej na trenutnem drevesu. Primerja ga s prejšnjo rešitvijo in v primeru, da bolj ustreza vhodnim podatkom, rešitev sprejme. Iskanje traja, dokler se stanje spreminja na boljše oziroma dokler se ne ustali – konvergira. Kot statistično podporo skupin smo uporabili posteriorno verjetnost (angl. posterior probability), ki predstavlja delež, v katerem se določena skupina pojavi med vsemi vzorčenimi drevesi (z izjemo začetnih 25% dreves).

Za izris molekularnih filogenetskih dreves je ključen izbor primernega evolucijskega modela, ki najbolje opiše, kako hitro in na kakšen način se v določenem zaporedju kopijo substitucije. Kateri model je najprimernejši, se oceni iz analiziranih nukleotidnih zaporedij. Poznamo številne substitucijske modele (JC, K2P, HKY, TN, GTR,...), ki spremembe v nukleotidnih zaporedjih ocenjujejo z različnimi matematičnimi in statističnimi algoritmi (Hall, 2013).

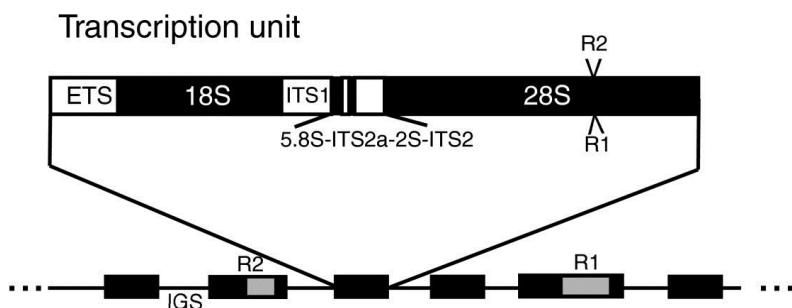
Drevesa, osnovana na enem genu imenujemo tudi genska drevesa (Avise, 2000). Danes vemo, da (zaradi razlik v molekularni uri) imajo različni geni različno evolucijsko zgodovino in kot rezultat dajejo različna filogenetska oz. genska drevesa. Zato danes v filogenetske raziskave vključujemo podatke iz večih lokusov, lahko tudi iz večih

genomskih predelov (torej jedrno in mitohondrijsko DNA, ter dodatno DNA kloroplastov pri rastlinah). S tem se izognemo napakam značilnih za en gen ter lahko natančneje rekonstruiramo filogenijo. Natančnost povečamo tudi z dodajanjem novih taksonov, kar skrajšuje veje v filogenetskem drevesu in zmanjšuje napake, ki so posledica homoplazij (Hajibabaei in sod., 2007). Nekateri avtorji so mnenja, da je dodajanje novih/dodatnih taksonov bolj pomembno za filogenetsko ločljivost kot dodajanje novih genov (Wiens, 2003).

Za filogenetske analize se uporabljo številni molekularni označevalci. Ker je to področje precej obsežno, bomo na kratko predstavili genetske označevalce, ki smo jih uporabili v svojih analizah:

1. Mitohondrijski gen, ki kodira encim dihalne verige citokrom-oksidaza I (COI), dolg približno 650 nukleotidov, je vsesplošno uporabljen genski marker za filogenetske analize (Avise, 2001), uporablja se tudi v analizi DNA črtnih kod za namen identifikacije organizmov (Keller, 2011). Pomembne lastnosti gena COI so robustni in konzervativni začetni oligonukleotidi (primerji), ki omogočajo pomnoževanje nukleotidnega odseka za gen COI iz predstavnikov večine, če ne celo vseh živalskih debel (Folmer in sod., 1994). Gen COI ima tudi visoko stopnjo zamenjave tretje baze v kodonu, kar vodi v hitro molekularno evolucijo, ki je dva in pol do trikrat hitrejša kot pri genih za 12S in 16S ribosomsko RNA. Kljub hitri evoluciji pa COI vseeno vsebuje največ filogenetske informacije med vsemi mitohondrijskimi geni, ki kodirajo proteine (Knowlton in Weigt, 1998).
2. Mitohondrijski gen 16S rDNA je eden od dveh mitohondrijskih ribosomskih genov, ki se prepiše v veliko podenoto ribosoma. Primeren je za razreševanje evolucijskih odnosov med družinami, rodovi in vrstami.
3. Zaporedje ITS2 je del jedrne DNA, ki se nahaja v sklopu jedrne ribosomske DNA (Slika 3). Nahaja se med genom za veliko jedrno ribosomsko podenoto (LSU, 28S) in genom za 5,8S ribosomsko DNA. Regija ITS2 je močno variabilna in se uporablja za razreševanje nejasnosti nižjih taksonomski kategorij, kot so rodovi, vrste in populacije (Coleman, 2003). Lastnost ribosomalne RNA (tako ribosomalni geni kot njihovi spacerji) je, da se po prepisu zvije v specifično sekundarno

strukturo. Zaporedij ITS2 v zrelem ribosomu ni, sodelujejo pa pri zvijanju rRNA v sekundarno strukturo med ribogenezo. Sekundarna struktura ribosomalne RNA je evolucijsko konzervativna (Keller, 2010). Kot poroča Keller (2010), je nukleotidno zaporedje ITS2 zelo primeren filogenetski marker, zelo obetavne so študije, ki vključujejo tako primarno (variabilno) kot sekundarno (konzervativno) strukturo ITS2; v ta namen je bil izdelan program za izpeljavo filogenije z uporabo primarne in sekundarne strukture (Seibel in sod., 2006). V naši raziskavi je regija ITS2 bila prvič uporabljena za filogenetske raziskave potočnih rakov rodu *Austropotamobius*. Preverili smo tudi možnost uporabe sekundarne strukture, vendar so bile naše sekvence prekratke.



Slika 3: Organizacija jedrne ribosomalne DNA (Stage in Eickbush, 2009: 4).

Figure 3: Organization of nuclear ribosomal transcription unit (Stage in Eickbush, 2009: 4).

2.5 OSNOVE BIOLOŠKE SISTEMATIKE IN KONCEPT VRSTE

Sodobna sistematika je veda o biodiverziteti, ki preučuje in razlaga raznolikost življenja v sedanosti in preteklosti, ter določa sorodstveno povezanost med živimi bitji (Simpson in Cracraft, 1995). Kot poudarja Trontelj (2009), mora sistem odsevati resničnost narave, torej upoštevati njene procese in zakonitosti, in ne sme biti poenostavljen in umetno (glede na znanstvena prepričanja) prikrojen. Bistvo naravnega sistema je, da skupine v njem obstajajo kot naravne enote, nastale z evolucijo. Skupino organizmov je torej potrebno obravnavati v skladu z njeno evolucijsko zgodovino (filogenijo). Willi Hennig je sredi 20. stoletja postavil temelje filogenetski sistematiki, ki je danes precej splošno sprejeta kot

edina možna pot do naravnega sistema (Trontelj, 2009). Biološka sistematika temelji na treh glavnih naravoznanstvenih disciplinah: (1) taksonomiji, ki se ukvarja z identifikacijo, opisom in poimenovanjem taksonov; (2) filogenetiki, ki tem taksonomskim enotam pripisuje sorodstvene odnose, jih hierarhično razvrsti ter poskuša rekonstruirati njihovo evolucijsko zgodovino (filogenijo); (3) filogeografski (panoga biogeografije), ki raziskuje principe in procese, ki vplivajo na geografsko razporeditev rodovniških linij, predvsem pri ožje sorodnih taksonih (vrste in podvrste) (Avise, 2001). Sistematika polaga temelje številnim biološkim disciplinam, kot sta ekologija in naravovarstvo.

2.5.1 Taksonomija

Prve taksonomske študije (tradicionalna taksonomija) so temeljile na preučevanju morfoloških znakov. Mnogokrat se je izkazalo, da so morfološki znaki v veliki meri homoplastični, kar lahko privede do napačne identifikacije in podcenjevanja števila vrst, določanje genealogij pa je izjemno pristransko. Z razvojem molekularnih znanosti se je molekula DNA pokazala ne samo kot primerna, ampak celo nujna pri razreševanju določenih vprašanj tudi v biološki sistematiki. Danes si težko predstavljam filogenetske, taksonomske in filogeografske analize brez molekule DNA. Zmeraj bolj se poudarja pomembnost celostnega pristopa, tako da v integralni taksonomiji uporabljajo izsledke filogenetskih raziskav, primerjalne embriologije, citologije, biokemije, paleontološke podatke, ipd.

Na eni strani je obsežna uporaba molekularnih podatkov botrovala k revoluciji v taksonomiji (kot primer navajamo bazo podatkov za identifikacijo živih bitij BOLD; Ratnasingham in Hebert, 2007), na drugi strani pa je deležna številnih kritik v zvezi z veljavnostjo, zanesljivostjo, natančnostjo in praktičnostjo molekularnih pristopov (Moritz in Cicero 2004; Will in Rubinoff, 2004). Kot poudarjata Vogler in Monaghan (2006), je treba razlikovati med taksonomijo na osnovi DNA in metodo črtnih kod DNA; prva se namreč ukvarja z razmejitvijo/ločevanjem vrst z uporabo evolucijskega koncepta vrste, medtem ko nam metoda črtnih kod DNA omogoča identifikacijo entitet glede na podobnost sekvenc.

2.5.2 Koncept vrste

Kot eno izmed pomembnejših vprašanj v biologiji je vprašanje vrste, ki so ga naravoslovci skozi čas interpretirali v skladu s takratnimi nazori in prepričanji in lastnim razumevanjem evolucije oziroma naravnih procesov. Tako so se izoblikovali različni vrstni koncepti, ki jih je po navedbah Malleta (2005) vsaj 15, zaenkrat še brez sprejetega konsenza; in vendar je uporaba vrstnega koncepta eden izmed temeljnih kriterijev v biološki sistematiki, saj vrsta, kot naravna enota, predstavlja temeljno enoto biodiverzitete (Mayr, 2001).

Prvi, ki je »vrsto« označil kot osnovno enoto v taksonomski klasifikaciji je bil oče moderne taksonomije C. Linnaeus, ki je v svojem delu *Systema Naturae* (1735) formalno uvedel sistem na osnovi binominalnega poimenovanja vrst. Tudi Darwin (1859) se je v svojem delu srečal s problemom koncepta vrste (morfološki koncept vrste) in smotrno izjavil, da: » /.../ nobena razlaga vrste še ni bila zadovoljiva za vse naravoslovce, in vsak naravoslovec je nejasen, ko govorí o vrsti.« Evolucijski biologi so nekako zavzeli stališče, da so vrste realne in fundamentalne naravne enote, ki jih lahko glede na razlike kvalitativno uvrstimo v nižje in višje taksonomske enote ter da vrsta predstavlja fazo/stopnjo v procesu evolucije, z njeno raznolikostjo kot produkt serije speciacij in izumiranj (Keller, 2010). Ker lahko raznolikost vrst raziskujemo na številnih nivojih, jo na vsakem nivoju tudi lahko različno ovrednotimo. Raznolikosti polna narava je »krivec« za tako pester nabor vrstnih konceptov, od katerih navajam nekaj najpomembnejših (cit. po Mallet, 2005): morfološki (Darwin, 1859), reproduktivni (Poulton, 1904), evolucijski (Simpson, 1951), kladistični (Henning, 1968; Ridley, 2004), populacijski (Ehrlich in Raven, 1969), biološki (Mayr, 1970), fenetski (Sokal in Crovello, 1970), ekološki (Van Valen, 1976), prepoznavni (Paterson, 1985), filogenetski (Cracraft, 1989), genealoški (Baum in Shaw, 1995), genomski (Mallet, 1995), kohezivni (Templeton, 1998), koncept splošnih linij (de Queiroz, 1998), taksonomija brez vrst (Mishler, 1999; Hendry, 2000), genetski (Baker & Bradley 2006).

V znanosti je vrsta predvsem pomembna za opisovanje biodiverzitete in testiranje bioloških hipotez (Keller, 2010). V novejši rekonstrukciji evolucijske zgodovine se molekularni podatki prednostno uporabljajo in kot trdi Keller (2010) imajo filogenetski vzorci potencial za opis biodiverzitete na najbolj fin način, torej na osnovi njihove

evolucijske zgodovine. Uporaba različnih vrstnih konceptov lahko privede do nasprotujučih si ocen o taksonomskih enotah (de Queiroz, 2007). Novejše raziskave se pogosto nagibanju k preveč striktnim filogenetskim kriterijem za določitev/razmejitev vrst, kar lahko privede do precenjevanja števila vrst v primerjavi z biološkim vrstnim konceptom (Flot in sod., 2010, 2011). Kar je bistveno in kot je že v svojem slavnem delu leta 1859 poudaril Darwin, mora biti prava klasifikacija genealoška; torej mora biti vrsta naravna enota in sistem mora odsevati naravne procese, torej evolucijsko zgodovino.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 OPIS PROUČEVANIH VZORCEV

V raziskavi smo analizirali 192 DNA vzorcev potočnih rakov rodu *Austropotamobius* iz 19 evropskih držav (Avstrija, Bolgarija, Bosna in Hercegovina, Črna Gora, Češka, Francija, Grčija, Hrvaška, Italija, Luksemburg, Madžarska, Makedonija, Nemčija, Portugalska, Romunija, Slovaška, Slovenija, Srbija, Turčija). Od teh smo za filogenetske analize uporabili 118 vzorcev. Podrobnosti za proučevane vzorce so navedene v Preglednici 2 in Preglednici 3 ter Prilogi 1 in Prilogi 2. Večina vzorcev izvira iz predhodnih raziskav potočnih rakov v Skupini za speleobiologijo Oddelka za Biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Vzorci so do analize DNA bili shranjeni v 96 % etanolu.

3.1.1 Takson *A. pallipes* sensu lato

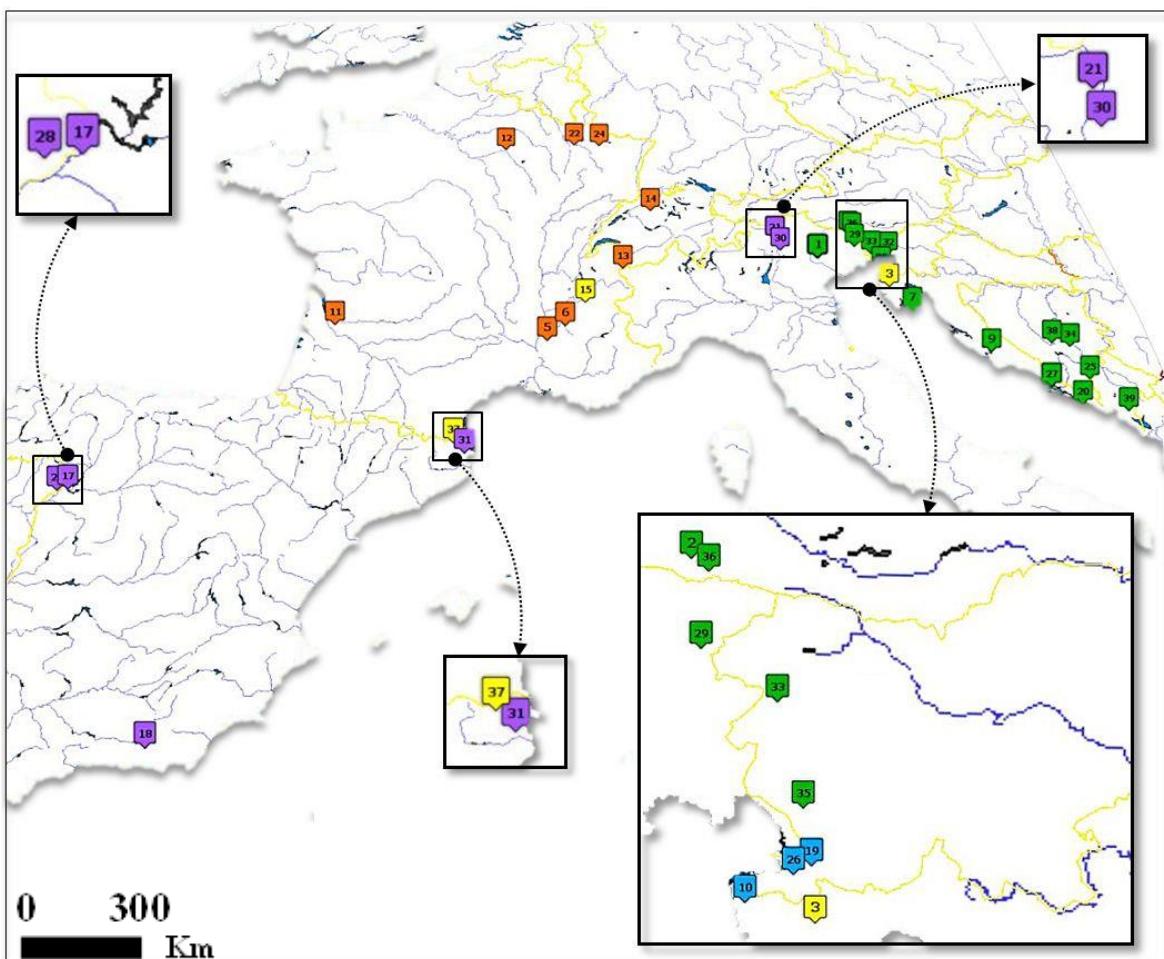
V filogenetskih raziskavah za takson *A. pallipes* sensu lato smo analizirali 51 vzorcev iz 39 lokacij. Natančen seznam lokacij analiziranih osebkov in pripadnost kladu in haplotipskim skupinam prikazujeta Preglednica 2 in Slika 4.

V filogenetske analize smo vključili tudi DNA zaporedja mitohondrijskih genov CO1 in 16S rDNA, dostopna na spletni strani GeneBank, ki so jih v predhodnih analizah uporabili drugi avtorji (Largiader in sod., 2000; Iaconelli, 2001; Grandjean in sod., 2002; Zaccara in sod., 2004; Fratini in sod., 2005; Trontelj in sod., 2005; Cataudella in sod. 2006, 2010; Sylvia in sod., 2007; Aceto in sod., 2008; Matallanas in sod., 2010; Pedraza-Lara in sod. 2010; Chiesa in sod., 2011). Oznake vzorcev, mesta vzorčenj, opredelitev v haplotipsko skupino, oznake za posamezni genetski označevalec (CO1, 16S rDNA, ITS2, združena DNA zaporedja) in koordinate mest vzorčenj so podrobneje navedene v Prilogi A.

Preglednica 2: Oznake preučevanih vzorcev za takson *A. pallipes sensu lato*. Prikazana so vzorčna mesta, opredelitev v haplotipsko skupino (povzeto po Trontelj in sod., 2005), oznake za posamezni genetski označevalci (CO1, 16S, ITS2) (id. – identičen predhodni).

Table 2: Summary of samples of *A. pallipes sensu lato*. With abbreviations, sampling locations, with haplogroup assignment (summarized by Trontelj et al., 2005) and assignments for genetic markers (CO1, 16S, ITS2).

	HAPLOTIP	HAPLOGROUP	CO1 sekvence	16S sekvence	ITS2 sekvence	LOKACIJA
1	APP_Belluno_IT	SEAlps+Wbalkans	APP_Belluno			Rio Cavalli, Belluno, IT
2	APP_BorenitzB_AT	SEAlps+Wbalkans	APP_SE-Alps	BorenitzB_AT	BorenitzBA	Borenitz Bach, Hermagor, AT
3	APP_BracanaP_HR	Apennine/Istra2	APP_Bracana	BracanaP, HR	BracanaPHR	Bračana potok, Buzet, HR
4	APP_CavalliBelluno_IT	SEAlps+Wbalkans	APP_Belluno	RioCavalli_I_4	RioCavalliiIT4	Rio Cavalli, Belluno, IT
5	APP_Citeles_FR	W Europe	APP_France	Citelles_Ren_F	CitellesF	Citelles, F
6	APP_Comane_FR	W Europe	APP_France	Comane_Ren_F	Ruisseau.d.MoulinF	Comane, F
7	APP_Cres2_HR	SEAlps+Wbalkans	APP_Cres	APP_Cres		Vransko jezero, Island Cres, HR
8	APP_Dalmatia_HR	SEAlps+Wbalkans	APP_Dalmatia			Jezero Modro Oko, Ploče, HR
9	APP_Dalmatia2_HR	SEAlps+Wbalkans	APP_Dalmatia	JezeroModroOko_HR		Vrba, Donje Postinje, Drniš, HR
10	APP_Dragonja_SI	Istra1*	APP_Dragonja	Dragonja_SLO	Dragonja2SLO	Dragonja River, Piran, SI
11	APP_France	W Europe	APP_France			Ruisseau.d.Moulin, FR
12	APP_France2	W Europe	APP_France	Ruisseau de Vassy, F		Ruisseau de Vassy, FR
13	APP_France3	W Europe	APP_France	Ruisseau.d.Moulin	Ruisseau.d.MoulinF	Eau Noire, FR
14	APP_Freiburg_D	W Europe		FreiburgimBreisgau_D		Freiburg im Breisgau, DE
15	APP_Gaudes1_FR	Apennine*	APP_Gaudes_6			Ruisseau des Gaudes (Isere), Rhone, F
16	APP_HypolithBach_IT	NW Italy	APP_Tyrol_2	Krebsbach_I_1	HypolithBachIT	Hypolith Bach Lana BZ, IT
17	APP_Iberic	NW Italy	APP_Iberic_4			Tortulhas, Miranda do Douro, PT
18	APP_Iberic	NW Italy	APP_Iberic_4			Arroyo, Guadix, Granada, ES
19	APP_Istra	Istra1*	APP_Istria			Glinščica, Kozina, SLO
20	APP_KonanovskiD_HR	SEAlps+Wbalkans	APP_Dalmatia	ZetaRiver(CG)_10	ZetaRiverCG5	Konavoski Dvori, Dubrovnik, HR
21	APP_Krebsbach_IT	NW Italy	APP_Tyrol_2	Krebsbach_I_1	KrebsbachAT2	Krebsbach, Lana, BZ, IT
22	APP_LongeauR_FR	W Europe	APP_France	RiviereLongeau_Moselle_F		Riviere Longeau, Moselle, FR
23	APP_Moosbachl_IT	SEAlps+Wbalkans	APP_Moosbachl	RioCavali_I_4		Moosbachl, DE
24	APP_Moselle_F	W Europe		RuisseauLHayeMoselle_F		Moselle, FR
25	APP_Musnica_BiH	SEAlps+Wbalkans	APP_Dalmatia	ZetaRiver(CG)_10	MusnicaBiH	Mušnica, BiH
26	APP_OsapskaR_SI	Istra1*		OsapskaR_SLO	OsapskaRSLO	Osapska reka, Koper, SI
26	APP_Osp2_SI	Istra1*	APP_Osp	OsapskaR_SLO	OsapskaRSLO	Osapska reka, Koper, SI
27	APP_Ploce2_HR	SEAlps+Wbalkans	APP_Ploce_HR	JezeroModroOko_HR		Jezero Modro Oko, Ploče, HR
28	APP_Redipolis_E_3	NW Italy		Redipollos_E_3		Castelo de algoso, tortulhas, P
4	APP_RioCavalli_IT				RioCavalliiIT4	Rio Cavalli, Belluno, IT
29	APP_RiodiZamlin_IT	SEAlps+Wbalkans	APP_SE-Alps	RiodiZamlin_I_8	RiodiZamlinIT	Rio di Zamlin, IT
30	APP_RitscherBach_IT	NW Italy	APP_Tyrol_2	RitscherB_I_2	RitscherBIT	Ritscher Bach, Entiklar, Tramin, IT
31	APP_SantGenis_ES	NW Italy	APP_Iberic	Rediopolis_ES		Sant-Genis, Espolla, Figueres, ES
2	APP_SE-Alps	SEAlps+Wbalkans	APP_SE-Alps			Borenitz Bach, Hermagor, AT
32	APP_Soca_SI	SEAlps+Wbalkans	APP_Soca			Sopotnica, Gabrje, SLO
33	APP_Sopotnica_SI	SEAlps+Wbalkans	APP_Sopotnica	Sopotnica_SLO	Vipava_SLO3	Sopotnica Creek, Tolmin, SI
28	APP_Tortulhas_PT	NW Italy	APP_Iberic	Rediopolis_ES	KrebsbachIT2	Ribeiro Das Tortulhas, P
4	APP_TrivaBelluno_IT	SEAlps+Wbalkans	APP_Belluno	RioTriva	Vipava_SLO3	Rio Triva, Sèdico, Belluno, IT
34	APP_Trebinje_BiH	SEAlps+Wbalkans	APP_Trebinje	Trebinjščica BiH		Trebišnjica River, Trebinje, BiH
21	APP_Tyrol_AT	NW Italy	APP_Tyrol_2			Krebsbach, Lana, BZ, IT
16	APP_Tyrol_AT	NW Italy	Hypolith Bach			Hypolith Bach Lana BZ, IT
35	APP_Vipava2_SI	SEAlps+Wbalkans	APP_Vipava	Vipava_SLO_9	Vipava_SLO3	Vipava, SLO
35	APP_Vipava3_SI	SEAlps+Wbalkans	APP_VIP7	Vipava_SLO_9	Vipava_SLO3	Vipava, SLO
36	APP_Wiesenbach_AT	SEAlps+Wbalkans	APP_Wiesenbach			Wiesenbach, Jadersdorf-Grünburg, AT
37	APP_Yoichi	Apennine*	APP_Yoichi			Can Guillet Brook, Reynès, FR
38	APP_Zalomka_BiH	SEAlps+Wbalkans	APP_ZalomkaBiH			Zalomka River, Fojnica, BiH
39	APP_ZetaRiver(CG)	SEAlps+Wbalkans	APP_Ploce	ZetaRiver(CG)_10	ZetaRiverCG5	Zeta River, Spuž, CG



Slika 4: Zemljevid preučevanega areala za takson *A. pallipes* sensu lato z označenimi vzorčnimi mesti in haplotipskimi skupinami. Izsek prikazuje podrobnejša mesta vzorčenj v Sloveniji. Podrobnejši opis vzorcev je naveden v Preglednici 2. Barvna legenda prikazuje haplotipske skupine in klad: oranžna (klad *A. pallipes* sensu stricto; haplotipska skupina W Europe), zelena (klad *A. italicus*; haplotipska skupina SEAlps +W Balkans), rumena (klad *A. italicus*; haplotipska skupina Apennine), vijolična (klad *A. italicus*; haplotipska skupina NW Italy), modra (klad *A. italicus*; haplotipska skupina Istra1).

Figure 4: Map of the study area for taxon *A. pallipes* sensu lato with localities and haplogroups. Detailed view represents detailed locations for Slovenian populations. For a detailed description see Table 2. Colour legend represents haplogroup and clad: orange (clad *A. pallipes* sensu stricto; haplogroup W Europe), green (clad *A. italicus*; haplogroup SEAlps +W Balkans), yellow (clad *A. italicus*; haplogroup Apennine), purple (clad *A. italicus*; haplogroup NW Italy), blue (clad *A. italicus*; haplogroup Istra1).

3.1.2 Takson *A. torrentium*

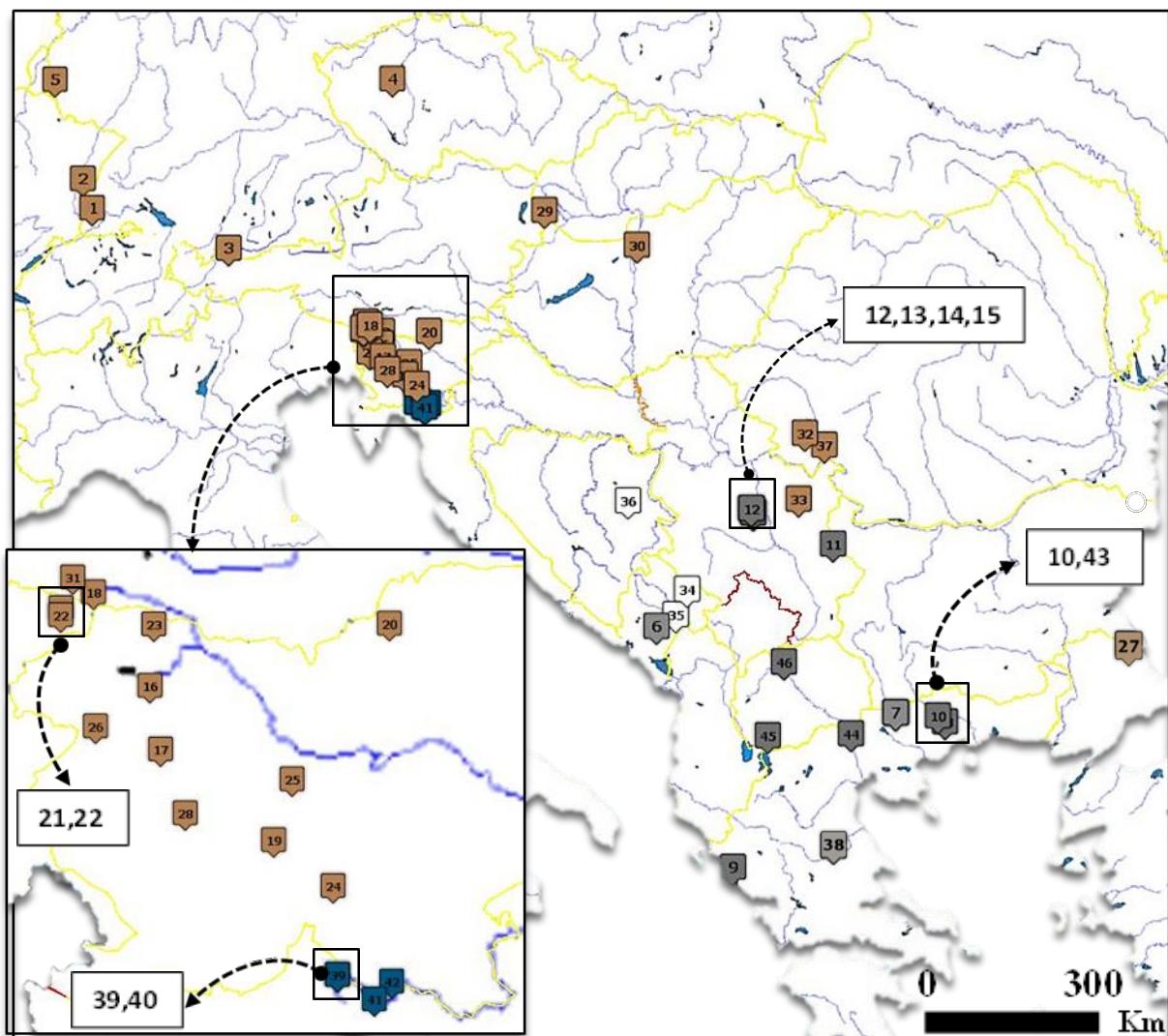
V filogenetskih analizah taksona *A. torrentium* smo uporabili 67 vzorcev iz 49 lokacij. Natančen seznam lokacij analiziranih osebkov in pripadnost kladu in haplotipskim skupinam prikazujeta Preglednica 3 in Slika 5.

V filogenetske analize smo vključili tudi DNA zaporedja mitohondrijskih genov CO1 in 16S rDNA, dostopna na spletni strani GeneBank, ki so jih v predhodnih analizah uporabili drugi avtorji (Trontelj in sod., 2005; Schubart in Huber, 2006; Klobučar in sod., 2012). Oznake vzorcev, mesta vzorčenj, opredelitev v haplotipsko skupino, oznake za posamezni genetski označevalec (CO1, 16S rDNA, ITS2, združena DNA zaporedja) in koordinate mest vzorčenj so podrobneje navedene v Prilogi B.

Preglednica 3: Oznake preučevanih vzorcev za takson A. torrentium. Prikazana so vzorčne mesta, opredelitev v haplotipsko skupino ter oznake za posamezni genetski označevalec (CO1, 16S, ITS2).

Table 3: Summary of samples of A. torrentium: with abbreviations, sampling locations and group assignment based on phylogenetic analyses (CO1, 16S, ITS2).

HAPLOTIP	HAPLOGRUP	CO1 sekvence	16S sekvence	ITS2 sekvence	LOKACIJA
11 APT_AldinackaB_SB	SB	Aldinacka_Brook_SB		Grapca_SLO	Aldinacka Brook, SB
2 APT_Alsace_F	CSE	11-APT_Alsace	Broumy	Alsace_F_2	Bremmelbaechel Alsace, F
3 APT_Alsace_F	CSE	11-APT_Alsace	Broumy	Alsace_F_2	Archbach Tyrol, A
4 APT_Alsace_F	CSE	11-APT_Alsace	Broumy	Alsace_F_2	Broumy, Česka
37 APT_Baile_Herculane_RO	CSE	Baile_Herculane_RO	CSEEUROPE_4	Baile_Herculane_RO	Baile Herculane, RO
44 APT_Batania2	SB	4-GR	4-GR	Batania_GR	Batania, Koúpa, Políkastro, GR
16 APT_Bohinj	CSE	APT_Bohinj			Bohinjska Bela, Bled, SI
15 APT_Bratesina_SB	SB	Bratesina_Tara_mountains_SB	SBALKANS_3	Alsace_F_2	Bratešina, Tara Mountains, SB
29 APT_Bratislava_SK	CSE	Bystricka_Bratislava_SK	CSEEUROPE_10		Bratislava, SK
1 APT_Breisgau	CSE	APT_Breisgau			Gailbach, Sarreguemines, FR
31 APT_Carinthia_AT	CSE	APT_Carinthia	2_SLO		Notsch, A
20 APT_CentrSI	CSE	6-APTCentrSLO	2_SLO	Alsace_F_2	Jazbinski Potok, Žerjav, SLO
21 APT_CentrSI	CSE	6-APTCentrSLO	2_SLO	Alsace_F_2	Piano di Fusine, Tarvisio, IT
22 APT_CentrSI	CSE	6-APTCentrSLO	2_SLO	Alsace_F_2	Rio dei Gamberi, tarvisio, IT
17 APT_Cerkno	CSE	APT_Cerkno			Cerkno, SI
33 APT_CernaR_SB	CSE	Vrkaluca_Cerna_Reka_SB	CernaR_SB	Koursovit_GR	Vrkaluca, Cerna Reka, SB
23 APT_Dovje2_SLO	CSE	APT_Dovje	Dovje_SLO		Dovje, Jesenice, SI
10 APT_Drama_GR	SB	EntranceontheAngitisCaveDrama_GR			Drama, GR
18 APT_Gail	CSE	APT_Gail	2-SLO		Zainer Bach, Arnoldstein, AT
24 APT_Glazi2_SLO	CSE	APT_Glazi	2_SLO		Gorenji Lazi, Ribnica, SI
25 APT_Glinscica2_SLO	CSE	APT_Glinscica	Glinscica_SLO		Glinsčica Creek, Ljubljana, SI
26 APT_Grapca2_SLO	CSE	APT_Grapca	2-SLO	Grapca_SLO	Baskagraha, Tolmin, SI
41 APT_GrivackiP2_SLO	Kolpa/GK	APT_GrivackiP	Kolpa	GrivackiP_SLO	Grivački Potok, Grivac, SLO
12 APT_Grosnica_SB	SB	9-SB	SBALKANS_3	Grosnica_SB	Grošnica, Kragujevac, SB
43 APT_Kefalari2	SB	APT_Kefalari	Kefalari_GR	Kefalari_GR	Ano Kefalari, Drama, GR
36 APT_Kladanj_BiH	CSE*	Kladanj_BiH	CSEEUROPE_9	Kladanj_BiH	Kladanj, BiH
42 APT_Kolpa2_SLO	Kolpa/GK	8-APT-Kolpa	Kolpa	Kolpa_SLO	Kolpa, Dolenja Žaga, SLO
8 APT_Koursovit2	SB	APT_Kousovit	Koursovit_GR	Koursovit_GR	Koursovit, Karidohori, GR
30 APT_KovacsP_HU	CSE	Kovacs_patak_Marianostriza_HU	CSEEUROPE_10	Alsace_F_2	Kovacs patak, Marianostriza, HU
13 APT_Kragujevac_SB	SB	9-SB (FA-SB)	SBALKANS_3		Zdraljica, Kragujevac, SB
34 APT_LimR(CG	CSE*	Lim_River_at_Murino(CG	LimR(CG	Kladanj_BiH	Lim River, CG
9 APT_Maras2_GR	SB	APT_Maras	Maras_GR	Maras_GR	Maras, GR
45 APT_Markova_MK	SB		MarkovaR_MK		Markova, MK
7 APT_Milli1c	SB	1-GR	7-GR	Koursovit_GR	Milli, Sidirokastro, GR
7 APT_Milli2c	SB	3-GR	7-GR	Koursovit_GR	Milli, Sidirokastro, GR
40 APT_Nežica_Kolpa_SLO	Kolpa/GK	Nežica_Kolpa_SLO	Kolpa		Nežica, SI
39 APT_Osilnica2_SLO	Kolpa/GK	APT_Osilnica	Kolpa	Osilnica_SLO	nad Belico, Osilnica, Kolpa
38 APT_Petrino_GR	SB	Petrino_GR			Petrino, GR
14 APT_Raca_SB	SB	Raca_TaraMountains_SB	Raca_Taramountains_SB	Alsace_F_2	Rača, Tara mountains SB
19 APT_Rakitna2	CSE	APT_Rakitna		Rakitna_SLO	Rakitna, SI
32 APT_RaulNera_RO	CSE	Riul Tarova Nera_Drainage_RO	CSEEUROPE_4	Riul_Tarova_RO	Riul Tarova Nera Drainage, RO
6 APT_RCrnojevica2	SB	5-CG	DolnjeSelo_CrnojevicaR(CG	Crnojevica(CG	Donje selo, CG
5 APT_Rouderbaach2	CSE	10_APT_Rouderbaach	CSEEUROPE_10	Alsace_F_2	Rouderbaach, LU
46 APT_Serava_MK	SB		Serava_MK		Serava, MK
35 APT_TaraR(CG	CSE*	Tara_River(CG	TaraR(CG		Tara river, CG
27 APT_Velika2_TR	CSE	APT_Velika	Velika_TR	Velika_TR	Velika, Demirköy, TR
28 APT_Zala2_SLO	CSE	APT_Zala	2_SLO		Zala Creek, Godovič, Idrija, SI
49 APT_Zaplana_SLO	CSE	APT_Zaplana		Osenovska_BG	Zaplana, Logatec, SI
					Osenovska, Dolno Osenovo, BG
					Belica_BG
					Belica, Vonešta Voda, BG



Slika 5: Zemljevid preučevanega areala za takson *A. torrentium* z označenimi vzorčnimi mesti in haplotipskimi skupinami. Izsek prikazuje podrobnejša mesta vzorčenj v Sloveniji. Podrobnejši opis vzorcev je naveden v Preglednici 3. Barvna legenda prikazuje haplotipske skupine: Kolpa (temno modro), SB (sivo), CSE (rjavo) in CSE* (belo). Številke v oklepaju prikazujejo število nukleotidnih substitucij.

Figure 5: Map of the study area for taxon *A. torrentium* with localities and haplogroups. Detailed view represents detailed locations for Slovenian populations. For a detailed description see Table 3. Colour legend represents haplogroup: Kolpa (dark blue), SB (grey), CSE (brown) in CSE* (white). Numbers in brackets represent amount of substitutions.

3.2 IZOLACIJA DNA

Po morfološkem pregledu in določitvi vrst smo izbranim osebkov z britvico odstranili košček anten in jih do DNA analiz shranili v 96 % etanolu.

DNA smo izolirali s kompletom GeneElute Mammalian Genomic DNA minprep kit (Sigma, ZDA) po protokolu "Mammalian Tissue Preparation" navedenem v navodilih proizvajalca. Končne izolate smo shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.3 POMNOŽEVANJE DNA Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO (PCR)

Po izolaciji DNA smo v verižni reakciji s polimerazo (PCR) pomnožili približno 650 baznih parov (bp) dolg odsek mitohondrijskega gena za citokrom C oksidazno podenoto I (COI), približno 500 bp dolg odsek mitohondrijskega gena za 16S ribosomske DNA (16S rDNA) in približno 1050 bp dolg jedrni odsek ribosomske DNA (ITS2). S pomnoževanjem DNA v 15 µl reakcijah smo pri vseh treh genih preverili prileganje začetnih oligonukleotidov (angl. primer) na izolirano DNA in optimizirali program PCR. Zadostno količino produktov PCR za določanje nukleotidnih zaporedij smo zagotovili s pomnoževanjem DNA v 45 µl reakcijah. Za pomnoževanje DNA smo uporabljali "2720 Thermal Cycler" (Applied Biosystems, ZDA) in "Mastercycler® ep" (Eppendorf, Nemčija).

Sestava 15 µl reakcije:

- 11,33 µl H₂O,
- 1,6 µl 10 x pufra PCR z MgCl₂,
- 1,6 µl 2 mM dNTP,
- 0,2 µl [20 µM] začetnega oligonukleotida 1 (primer 1),
- 0,2 µl [20 µM] začetnega oligonukleotida 2 (primer 2),
- 0,07 µl [5 U/µl] Taq- polimeraze,
- 1 µl vzorčne DNA.

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

- LCO1490: (5'-3') GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG,
- HCO2198: (5'-3') TAAACTTCAGGGTACCAAAAAATCA.

Začetna oligonukleotida za odsek gena za 16S rDNA (Simon in sod., 1994):

- 16Sar (5'-3') CGCCTGTTATCAAAACAT,
- 16Sbr (5'-3') CCGGTCTGAACTCAGATCACGT.

Začetna oligonukleotida za odsek jedrnega zaporedja ITS2 (White in sod., 1990):

- ITS3 (5'-3') GCATCGATGAAGAACGCAGC,
- ITS4 (5'-3') TCCTCCGCTTATTGATATGC.

Pogoji PCR za odsek gena CO1 so bili: 3 minute začetne denaturacije pri 94 °C, ki ji je sledilo 34 ciklov (45 sekundna denaturacije pri 94 °C, 45 sekundnega naleganja začetnih nukleotidov pri 48 °C ter 60 sekund podaljševanja pri 72 °C). Na koncu je sledilo še sedemminutno končno podaljševanje pri 72 °C.

Pogoji PCR reakcije za odsek gena 16S rDNA so bili: 3 minute začetne denaturacije pri 94 °C, ki ji je sledilo 35 ciklov (45 sekundna denaturacije pri 94 °C, 45 sekundnega naleganja začetnih nukleotidov pri 55 °C ter 60 sekund podaljševanja pri 72 °C). Na koncu je sledilo še sedemminutno končno podaljševanje pri 72 °C.

Pogoji PCR reakcije za zaporedje ITS2 so bili: 3 minute začetne denaturacije pri 94 °C, ki ji je sledilo 35 ciklov (30 sekundna denaturacije pri 94 °C, 30 sekundnega naleganja začetnih nukleotidov pri 55 °C ter 45 sekund podaljševanja pri 72 °C). Na koncu je sledilo še sedemminutno končno podaljševanje pri 72 °C.

Količino in dolžino pomnoženega fragmenta smo po vsakem pomnoževanju preverili s horizontalno elektroforezo v 1 % agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom v 1 x pufru TAE.

V nekaterih primerih kljub večkratnim ponovitvam in optimizaciji postopkov iz izolirane DNA nismo uspeli pomnožiti želenih zaporedij. Predvsem smo imeli težave pri izolaciji jedrnega zaporedja ITS2. Zaradi tega se nabori vzorcev v analizah uporabljenih sekvenc za gen COI, 16S rDNA ter za zaporedje ITS2 nekoliko razlikujejo.

3.4 ČIŠČENJE PRODUKTOV PCR

Čiščenje produktov PCR smo opravili po sledečem protokolu:

- v 75 µl reakciji smo ponovno pomnožili fragment vzorčne DNA,
- celoten produkt PCR smo skupaj z aplikacijskim barvilom (2 µl) nanesli na 2 % agarozni gel z dodanim etidijevim bromidom,
- elektroforeza je prvih 10 min potekala pri 20 V, nadalje pa pri 55-60 V, dokler ni aplikacijski pufer pripravljal do sredine gela,
- na transluminatorju smo gel osvetlili z UV svetlobo in s skalpelom označili želeni produkt tako, da smo pod njim naredili zarezo,
- pod želenim produkтом smo v gel naredili luknjico in do vrha napolnili s pufrom TAE,
- sledila je elektroforeza pri 200 V (45 s), pri čemer je želeni produkt spralo v pufer, ki smo ga s pipeto prenesli v mikrocentrifugirko,
- luknjico smo ponovno napolnili z 1 x pufrom TAE, ponovili elektroforezo pri 200 V in želeni produkt skupaj s pufrom ponovno prenesli v mikrocentrifugirko,
- na koncu smo produkt PCR očistili še s kompletom "GeneJETTM PCR Purification Kit" (Fermentas, Litva) po navodilih proizvajalca.

3.5 DOLOČANJE IN ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ

Vsem očiščenim produktom PCR so, po Sangerjevi metodi, v podjetju Macrogen (Južna Koreja) določili nukleotidno zaporedje.

Kromatograme vseh treh analiziranih DNA zaporedij smo pregledali in po potrebi popravili ter izločili vsa slabo berljiva in dvoumna zaporedja s program ChromasPro 1.5 (Technelysium, Avstralija). Kjer je bilo potrebno, smo odstranili začetne in končne dele zaporedij s šumom, ter morebitne dele začetnih oligonukleotidov, pri čemer smo uporabili program BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999) in MEGA6 (Tamura in sod., 2013). Vse tri sklope

zaporedij (16S rRNA, CO1 in ITS2) smo poravnali s programom MAFFT (verzija 7, Kazutaka in sod., 2013), pri čemer smo za protein-kodirajoča DNA odseka mitohondrijskega gena CO1 upoštevali kod za nevretenčarsko mitohondrijsko DNA ter ga po poravnavi prevedli v aminokislinsko zaporedje in preverili morebitno prisotnost stop kodonov s programom MEGA6 (Tamura in sod., 2013). Za iskanje identičnih sekvenc smo uporabili program Dambe 5.2.5. (Xia in Xie, 2001).

Jedrna zaporedja ITS2 so bila v tej raziskavi prvič uporabljeni za analizo evolucijske zgodovine potočnih rakov rodu *Austropotamobius*. Z njimi smo izvedli filogenetske analize z metodo BI ter metodo ABGD. S programom 4SALE (Seibel in sod., 2006) smo ITS2 zaporedjem poskusili določiti sekundarno strukturo, kar pa je bilo zaradi manjkajočih delov v regiji 5', neuspešno.

3.6 OCENITEV GENETSKE RAZNOLIKOSTI

S programom DnaSP (Rozas in Rozas, 1995) smo na osnovi poravnanih zaporedij CO1 določili število haplotipov za oba tradicionalna taksona *A. pallipes* sensu lato in *A. torrentium*.

S programom MEGA6 (Tamura in sod., 2013) smo izračunali genetsko raznolikost za gen CO1 (razdalja parnih sekvenc: p - razdalja) za :

- med tradicionalnima vrstama *A. pallipes* sensu lato in *A. torrentium*,
- med glavnimi haplotipskimi skupinami znotraj kladov *A. pallipes* sensu lato in *A. torrentium*.

3.7 FILOGENETSKE ANALIZE

Za filogenetske analize smo našim DNA vzorcem dodali še homologna nukleotidna zaporedja iz regij dveh mitohondrijskih genov (16S rDNA in CO1) objavljena v bazi

GeneBank, ki so bila uporabljena v predhodnih filogenetskih analizah (podrobnosti so navedene v Prilogi A in Prilogi B).

Filogenetske analize smo izvedli ločeno za obe filetski liniji *A. pallipes* sensu lato in *A. torrentium* in sicer v dveh sklopih:

1. na poravnanih zaporedjih odsekov DNA zaporedij za vsak lokus posebej (COI, 16S rDNA ter ITS2),
2. na združenih zaporedjih dveh ali treh lokusov (CO1+16S, CO1+ITS2 ali CO1+16S+ITS2 odvisno od obstoječih uporabnih DNA zaporedij), kar nam je omogočil program SequenceMatrix (Vaidya in sod., 2011). Kombinacijo zaporedij 16S rDNA in ITS2 smo zaradi neskladnih rezultatov izločili iz nadaljnjih analiz.

Z uporabo programov jModelTest 2 (Darriba in sod., 2012) in MEGA6 (Tamura in sod., 2013) smo po Akaikovem informacijskem kriteriju drugega reda (AICc) vsakemu lokusu določili najustreznejši evolucijski model, ki opisuje potek nukleotidnih substitucij v analiziranih zaporedjih. Dobljene evolucijske modele smo uporabili pri ocenitvi ter izrisu filogenetskega drevesa. Za koreninjenje filogenetskega drevesa smo kot zunanjo skupino (zunanjik) uporabili taksona drug drugemu. Za izris filogenetskega drevesa smo uporabili dve metodi na osnovi znakov:

1. metodo ML, ki nam omogoča določiti tisto topologijo filogenetskega drevesa, pri kateri je verjetnost, da bomo po določenem substitucijskem modelu dobili dano poravnavo zaporedij, največja. Izvedli smo jo s programom MEGA6 (Tamura in sod., 2013). To metodo smo uporabili za izris dreves za posamezne DNA lokuse in jih uporabili kot »user tree« v filogenetskih analizah z Bayesovim pristopom ter za DNA analizo za razmejitev vrst PTP.
2. metodo BI, ki smo jo izvedli s programom MrBayes v. 3.2.3 (Ronquist in Hulsenbeck, 2014). Dva neodvisna MCMC algoritma, vsak z eno hladno in tremi vročimi verigami, sta vzorčila pokrajino vseh možnih dreves, stanje hladne verige se je shranilo na vsakih 1000 generacij. Program MrBayes je tekel od 1 do 10 milijonov generacij, dokler vrednost za standardno deviacijo ločenih frekvenc (SD) ni padla pod 0.03, kot svetuje priročnik programa. Vrednost za PSRF (angl. potential scale reduction factor) je bila 1 za vse parametre. V vseh primerih smo

zavrgli prvo četrtino vzorčenih dreves (25 % burn-in), nato pa izrisali 50 % večinsko drevo soglasja. Statistično podporo kladov nam prikazujejo posteriorne verjetnosti. To metodo smo uporabili za izris dreves (Bayesov filogram) za posamezne DNA lokuse ter za združene lokuse. Drevesa smo pregledno uredili s programom FigTree1.3.1 (Rambaut, 2006).

3.8 ANALIZA MREŽNIH ODNOsov TER FILOGEOGRAFIJA TAKSONOV A. *pallipes* sensu lato IN A. *torrentium*

V genskih skladih populacij so lahko hkrati prisotni novi haplotipi potomcev kot tudi predniški haplotipi, med katerimi prihaja do rekombinacij. K zamreženim odnosom prispevajo še populacijski pojavi kot so hibridizacija, spolno razmnoževanje in homoplazija. Zato so za ocenitev odnosov med bližje sorodnimi sekvencami, bolj kot striktno hierarhična filogenetska drevesa, primerne metode za prikaz mrežnih evolucijskih odnosov, saj vključujejo možnost za obstoj mnogih predniških haplotipov v populaciji (Posada in Crandall 2001). Za razjasnitev filogeografije obeh taksonov *A. pallipes* sensu lato in *A. torrentium*, smo na osnovi CO1 haplotipov uporabili metodo mrežnih analiz MJN (Bandelt in sod., 1999), ki smo jo izvedli s programom PopART (<http://popart.otago.ac.nz>), pri čemer smo želeli dobiti najbolj varčno rešitev. Raziskali smo več vrednosti za homoplazijo (parameter ϵ), kjer ni bilo večjih odklonov v topologiji. Predstavljena topologija mrežnih analiz je pri vrednosti $\epsilon=0$.

Metoda MJN omogoča dodajanje manjkajočih haplotipov (kot mediani vektorji) in izračuna hipotetično število mutacijskih korakov (genetsko razdaljo med haplotipi). Posebno je uporabna v primerih, ko je geografska pokritost vrste nejasna in ko so genetske razdalje prevelike za metodo MP (Posada in Crandall 2001).

Analizo mrežnih odnosov za takson *A. pallipes* sensu lato smo izvedli na 399 bp dolgih zaporedjih CO1, saj je program za analizo upošteval najkrajšo dolžino sekvence, kar so v naši analize predstavljala zaporedja avtorja Chiesa (Chiesa in sod., 2011). Posledica krajših sekvenc je bilo zmanjšanje števila haplotipov (kot smo jih določili za primarne CO1 sekvence), združeni haplotipi so navedeni v Prilogi C. Najkrajša zaporedja za takson *A.*

torrentium so bila dolga 491 bp, združeni haplotipi za metodo MJN so prikazani v Prilogi D.

Izris geografske razporeditve opredeljenih haplotipskih skupin smo izvedli s programom GoogleEarthPro v. 7 (2012).

3.9 DOLOČITEV HIPOTETIČNIH VRST Z METODAMI ZA RAZMEJITEV VRST Z DNA

Na osnovi rezultatov metod za razmejitev vrst z analizo enega genetskega markerja lahko postavimo primarno vrstno hipotezo (PSHs) (Puillandre in sod., 2012). Za analizo števila potencialnih vrst znotraj kladov *A. pallipes* sensu lato in *A. torrentium*, smo uporabili dve metodi za razmejitev vrst, ki sta v splošnem poznani kot »single locus approach«:

1. Distančno metodo ABGD,
2. Metodo na osnovi filogenetskega drevesa PTP.

Kljud prikladnosti in hitri obdelavi podatkov, ki jo te metode omogočajo, avtorji opozarjajo na številne težave, ki so jim te metode podvržene (vpliv psevdogenov, nepopolno sortiranja linij, introgresija, ...) in poudarjajo, da so za taksonomijo vrst primernejše integrativne filogenetske analize, ki vključujejo molekularne (najbolje na večih, nevezanih lokusih), morfološke, ekološke in biogeografske podatke.

Metoda ABGD (Puillandre in sod., 2012), je metoda, pri kateri se za razmejitev vrst uporabi matrika parnih genetskih razdalj. Določiti je potrebno prag za razmejitev vrst (faktor Pmax), v naši raziskavi smo uporabili $P_{max} = 0.03$ (ta prag velja efektiven za razmejitev vrst crustaceanov) (Costa in sod., 2009). Sekvence so razporejene v skupine tako, da je razdalja med dvema sekvcencama iz različnih skupin (med vrstna razdalja) zmeraj večja kot dan prag za razdalje. Pojav vrzeli v grafu (angl. barcode gap) je indikator za intra- in interspecifično variacijo.

Analize z metodo ABGD smo izvedli posamično za poravnana zaporedja odsekov genov CO1, 16S rDNA in zaporedja ITS2 ter kombinacija obeh mitohondrijskih genov 16S in

CO1, brez zunanjih skupin (angl. outgroup). Analize smo izvedli na spletnem serverju ABGD. Nastavitev programa so ostale privzete, spremenili smo faktor $P_{max} = 0.03$. V analizi smo uporabili K2P model.

Metoda PTP (Zhang in sod., 2013) je metoda za razmejitev vrst, ki temelji na filogenetskem drevesu. Ta metoda neposredno uporablja število substitucij (in je zato precej občutljiva na dolžino vej) ter predvideva, da verjetnost, da substitucije vodijo do speciacije, sledi Poissonovi razporeditvi. Dolžine vej drevesa predstavljajo dva neodvisna razreda Poissonovih dogodkov in sicer speciacijo in koalescenco. bPTP doda tudi vrednosti Bayesov podporo za razmejitev vrst.

Za izvedbo metode PTP smo uporabili ML drevo, ki smo ga izrisali v programu MEGA6 (Tamura in sod., 2013) za posamezne genetske označevalce ali MrBayes 3.2.3 (Ronquist in Huelsenbeck, 2014) v primeru združenih sekvenc. Evolucijske modele za posamezne sekvence smo izračunali s programom jModeltest (Posada, 2008), upoštevali smo Akaikov informacijski kriterij (AICc). Analize so bile izvedene s 500 000 generacijami MCMC, brez zunanje skupine in 25 % burn-in na spletnem serverju za bPTP analize (<http://species.h-its.org/>).

ABGD in PTP analize smo izvedli z naslednjimi genskimi označevalci:

- analiza odseka gena CO1,
- analiza odseka zaporedja ITS2,
- analiza odseka gena 16S rDNA,
- kombinacija obeh mitohondrijskih genov 16S rDNA in CO1.

V naši analizi se je bolje obnesla analiza ABGD, ki velja tudi za najbolj varčno (Puillandre in sod., 2012). Rezultati analiz odseka gena 16S rDNA ter kombinacija obeh mitohondrijskih genov (16S rDNA in CO1) so bili neuporabni.

4 REZULTATI

4.1 RAZREŠEVANJE TAKSONOMSKIH NEJASNOSTI RODU *Austropotamobius*

V raziskavah smo po urejanju in poravnavi DNA zaporedij uporabili:

- približno 600 bp dolge odseke mitohondrijskega gena CO1 (najkrajša zaporedja so bila dolga 399 bp (Chiesa in sod., 2011)),
- približno 550 bp dolge odseke mitohondrijskega gena 16S rDNA,
- približno 1050 bp dolge odseke jedrnega ITS2.

Vsa slabo berljiva in dvoumna DNA zaporedja smo izločili iz analiz. Podrobnosti vseh sekvenc, uporabljenih v filogenetskih analizah, so navedene v Preglednici 2 in Preglednici 3 ter Prilogah A in B.

4.1.1 Ocena genetske raznolikosti

Število haplotipov za oba taksona smo določili na osnovi CO1 zaporedij mtDNA:

- 75 haplotipov za takson *A. pallipes* sensu lato,
- 104 haplotipe za takson *A. torrentium*.

Oznake haplotipov in podrobnosti so navedene v Prilogi A in prilogi B.

Genetska raznolikost, prikazana kot **p-razdalja** za oba taksona, ki smo jo izračunali na osnovi CO1 zaporedij, je sledeča:

- p-razdalja med sestrskima taksonoma *A. pallipes* sensu lato in *A. torrentium*: 0.124 ± 0.015 ,
- p-razdalja med skupinama klad 1 (*A. pallipes* sensu stricto) in klad 2 (*A. italicus*): 0.084 ± 0.014 ,
- p-razdalja znotraj skupine *A. italicus*: 0.043 ± 0.028 ,
- p-razdalja za haplotipske skupine taksona *A. torrentium*:
 - skupina Kolpa in ostale skupine: 0.084 ± 0.012 ,

- skupina ZV in ostale skupine : 0.078 ± 0.009 ,
- skupina LD in ostale skupine: 0.076 ± 0.08 ,
- skupina ŽPB in ostale skupine: 0.081 ± 0.010 ,
- skupina BAN in ostale skupine: 0.064 ± 0.009 ,
- med skupina SB in CSE: 0.033 ± 0.009 .

4.1.2 Takson *A. pallipes*

4.1.2.1 Filogenetske analize taksona *A. pallipes* sensu lato

Evolucijski modeli za DNA zaporedja taksona *A. pallipes* sensu lato, ki so glede na AICc kriterij najbolje opisali evolucijski razvoj posameznih genskih zaporedij, so podani v Preglednici 4.

Preglednica 4: Evolucijski model za posamezne DNA lokuse za takson *A. pallipes*. Evolucijski modeli: GTR - splošni časovno reverzibilni model nukleotidne substitucije; HKY - Hasagawa Kishino Yano; TN93 - Tamura-Nei; Γ - gamma distribucija; I – nespremenljiva mesta.

Table 4: Evolutionary models for analysed DNA locuses for taxon *A. pallipes*. Substitution model: GTR - general time reversible; HKY - Hasagawa Kishino Yano; TN93 - Tamura-Nei; Γ - gamma distribution; I - invariable sites.

Lokus	Evolucijski model
CO1	GTR+ Γ + I
16S rDNA	HKY + Γ + I
ITS2	TN93

Substitucijske modele smo uporabili tudi za ocenitev in izris filogenetskih dreves na osnovi združenih zaporedij.

Vsa ocenjena filogenetska drevesa izdelana z zgoraj navedenimi filogenetskimi metodami (16S, ITS2 in združeni lokusi) (Slike 6, 7, 8, 9) imajo podobno bazalno topologijo, ki prikazujejo delitev *A. pallipes* sensu lato na dva samostojna klada z visoko podporo posteriorne verjetnosti ($pv = 1$), z izjemo BI drevesa filogenetskih odnosov na podlagi gena CO1, ki ne podpira dihotomne cepitve na dva klada, ampak prikazuje politomno cepitev na štiri filetske skupine, pri čemer izstopa dolga veja za haplotipe zahodne Evrope, ki kaže na veliko genetsko razdaljo teh haplotipov v primerjavi s haplotipi iz ostalih treh skupin. Naj

dodamo, da filogenetsko drevo z metodo ML za omenjeni gen kaže dihotomijo (torej delitev na dva monofiletska klada) za takson *A. pallipes* sensu lato (Priloga E).

Filogenetska analiza zaporedij ITS2 je dodatno potrdila delitev taksona *A. pallipes* sensu lato na dva monofiletska klada z visoko podporo ($p_v = 1$). Zaporedja ITS2 so iz jedrnega genoma in so neodvisna od 16S rDNA ter COI, iz česar lahko sklepamo, da med kladoma ni genskega pretoka. Sicer smo filogenetske analize izvedli na manjšem številu zaporedij ITS2 (veliko zaporedij je bilo neberljivih), kar se je odražalo v večji politomiji haplotipov v filogenetskih drevesih na osnovi nDNA.

Delitev taksona *A. pallipes* sensu lato na dva monofiletska klada dodatno podpira še velika genetsko razdaljo med kladoma (p -razdalja = 0.084 ± 0.014), kar nakazuje na obstoj dveh evolucijskih linij oz. hipotetičnih vrst, ki smo ju poimenovali v skladu z dosedanjimi raziskavami (Zaccara in sod., 2004; Fratini in sod., 2005): *A. pallipes* sensu stricto in *A. italicus*.

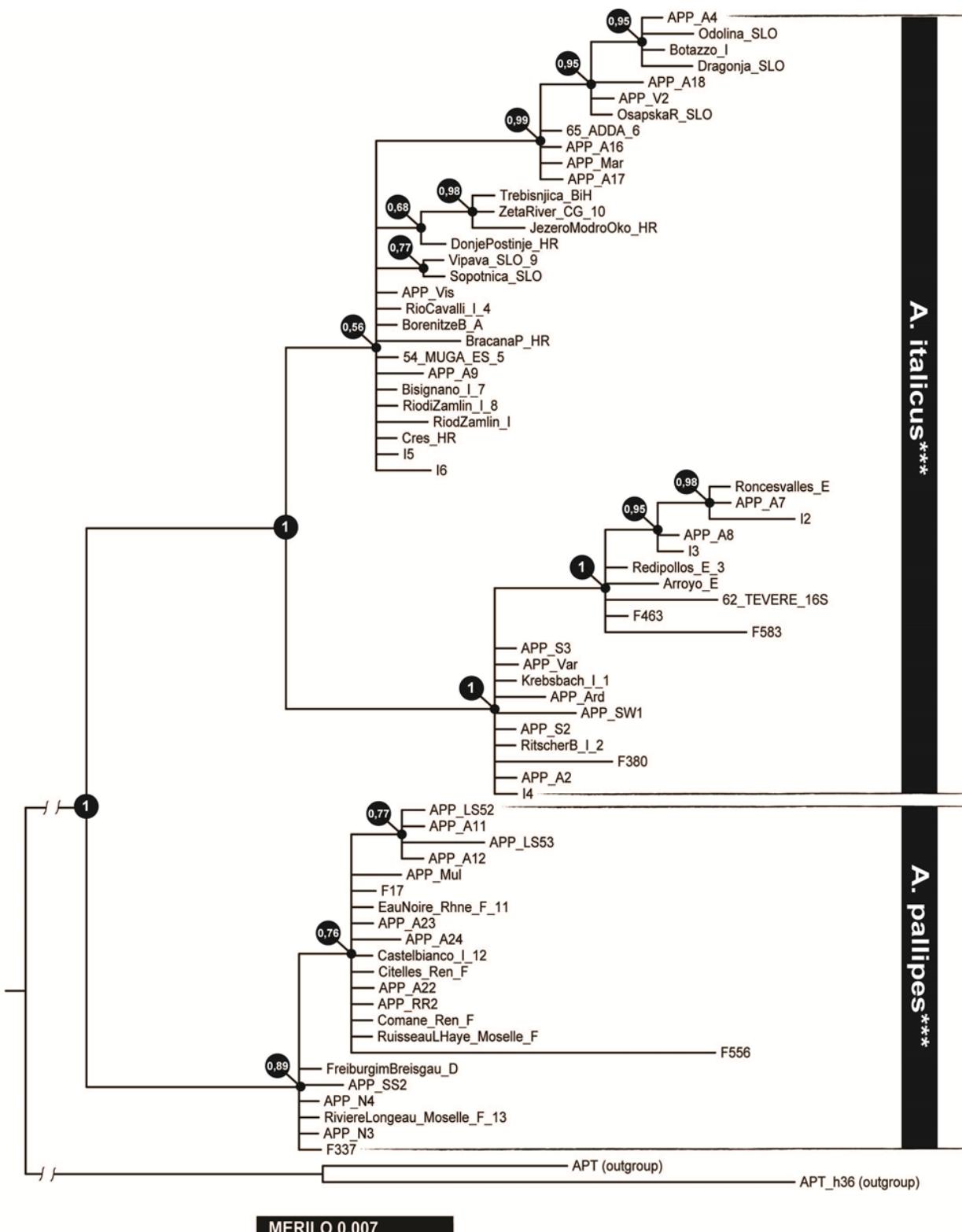
Opazna je tudi razlika v raznolikosti znotraj obeh kladov. Struktura klada *A. pallipes* sensu stricto je homogena, medtem ko je klad *A. italicus* molekulsko precej heterogen in v filogenetskih dreves na osnovi mtDNA in združenih zaporedij ga zastopajo 4 filetske linije. Znotraj skupin je precej nerazrešenih odnosov. Skupine so delno sovpadale s haplotipskimi skupinami, ki so jo za rod *Austropotamobius* na markerju CO1 opredelili Trontelj in sod. (2005), z izjemo haplotipske skupine Istra2, ki je v naši raziskavi nismo potrdili. Opredeljene skupine so delno sovpadale tudi s skupinami, ki so jim nekateri avtorji dodelili podvrstni status (Grandjean in sod., 2002; Zaccara in sod., 2004; Fratini in sod., 2005). V Preglednici 5 navajamo primerjavo haplotipskih skupin, vrst in podvrst za identificirane filetske linije.

Preglednica 5: Določitev haplotipske skupine/vrste/podvrste za identificirane filetske linije.

Table 5: Haplogrup names or species/subspecies names for identified phylogroups.

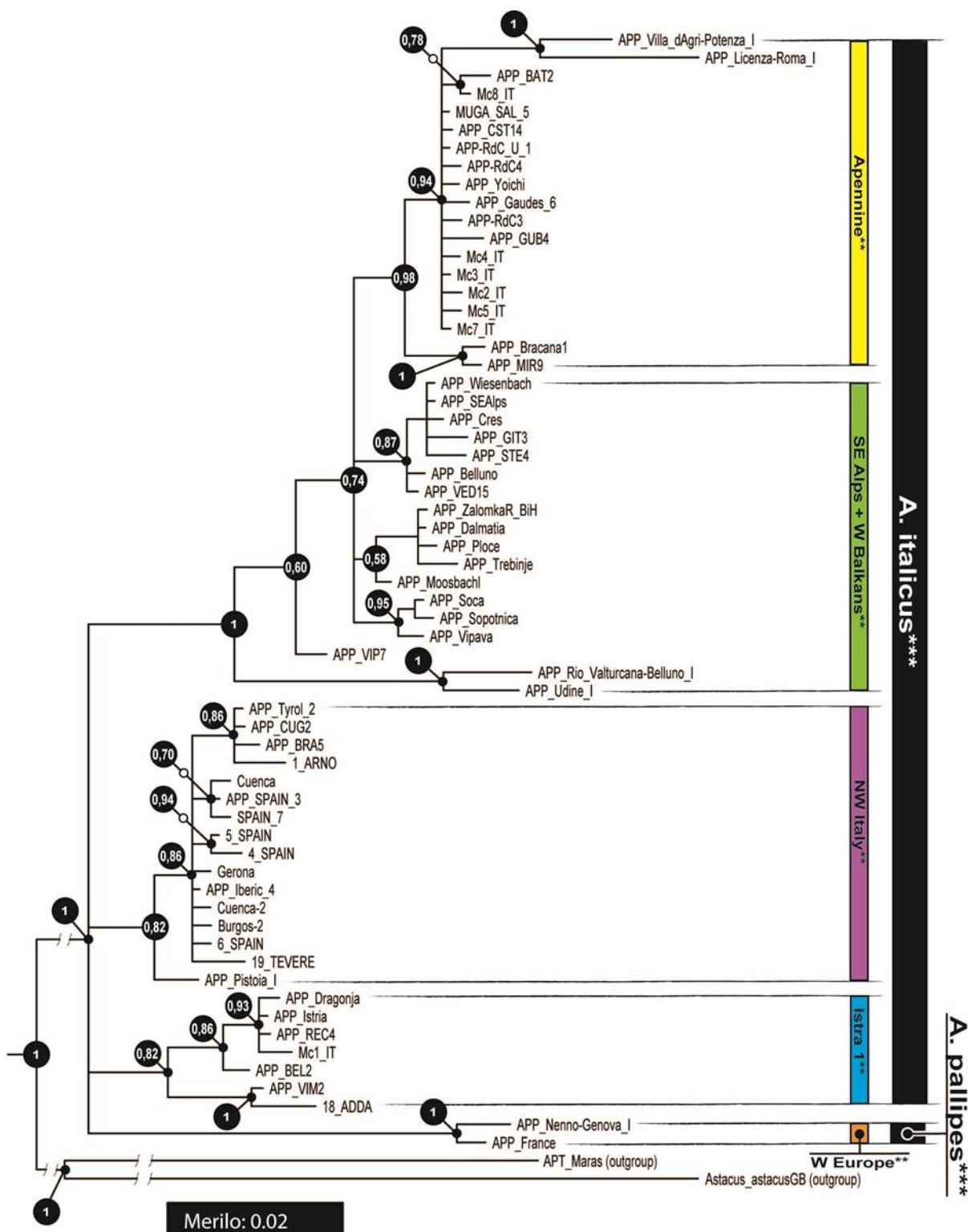
Haplotska skupina (Trontelj in sod., 2005)	Vrsta/podvrsta (Fratini in sod., 2005)	Razvrstitev v naši raziskavi
WEurope (Western Europe)	<i>A. pallipes</i>	Hipotetična vrsta <i>A. pallipes</i> sensu stricto
NWItaly (North Western Italy)	<i>A. italicus italicus</i> in <i>A. italicus carinthiacus</i>	Filetska linija NWItaly (znotraj hipotetične vrste <i>A. italicus</i>)
SEAlps-WBalkans (South Eastern Alps-Western Balkans)	<i>A. italicus meridionalis</i>	Filetska linija SEAlps-WBalkans + Apennine (znotraj hipotetične vrste <i>A. italicus</i>)
Apennine	<i>A. italicus meridionalis</i>	Filetska linija SEAlps-WBalkans + Apennine (znotraj hipotetične vrste <i>A. italicus</i>)
Istra 2	<i>A. italicus meridionalis</i>	Filetska linija SEAlps-WBalkans + Apennine (znotraj hipotetične vrste <i>A. italicus</i>)
Istra 1	<i>A. italicus carsicus</i>	Filetska linija Istra (hipotetična vrsta <i>A. italicus</i>)

Opomba: V filogenetskih analizah na osnovi CO1 in združenih lokusov so izstopala zaporedja avtorjev Chiesa in sod. (2011), ki so bila krajša od preostalih CO1 zaporedij (399bp), kar je vplivalo na topologijo dreves; teh 6 CO1 zaporedij (Udine, Rio Valturcana, Nenno-Genova, Pistoia, Licenza-Roma, Potenza) ima daljše veje in so običajno ločene od skupine. V analizi združenih lokusov je izstopal tudi haplotip APP_RioCavalliIT, ki je edini vseboval kombinacijo lokusov CO1 in ITS2.



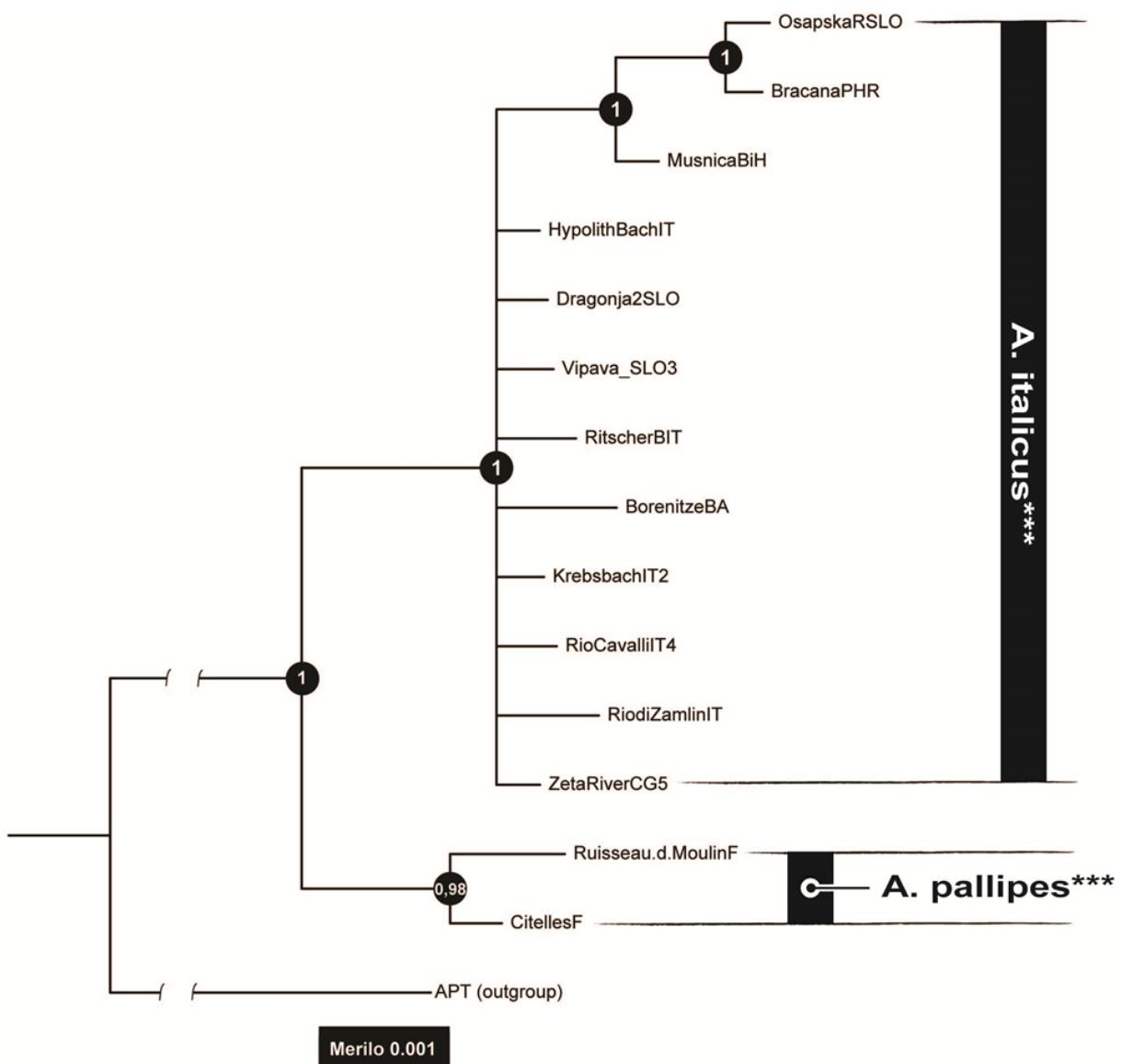
Slika 6: Bayesov filogram *A. pallipes* sensu lato na podlagi lokusa 16S rDNA. Številke v vozliščih prikazujejo posteriorne verjetnosti v deležih. Dolžine vej ustrezajo genetski razdalji (merilo). Ob desnem robu je prikazana delitev na hipotetične vrste (***)ta raziskava).

Figure 6: Bayesian phylogram of *A. pallipes* sensu lato inferred from gene 16S rDNA with Bayes statistics. Numbers at nodes indicate Bayesian posterior probabilities. Hypothetical species represented on right (***)this study).



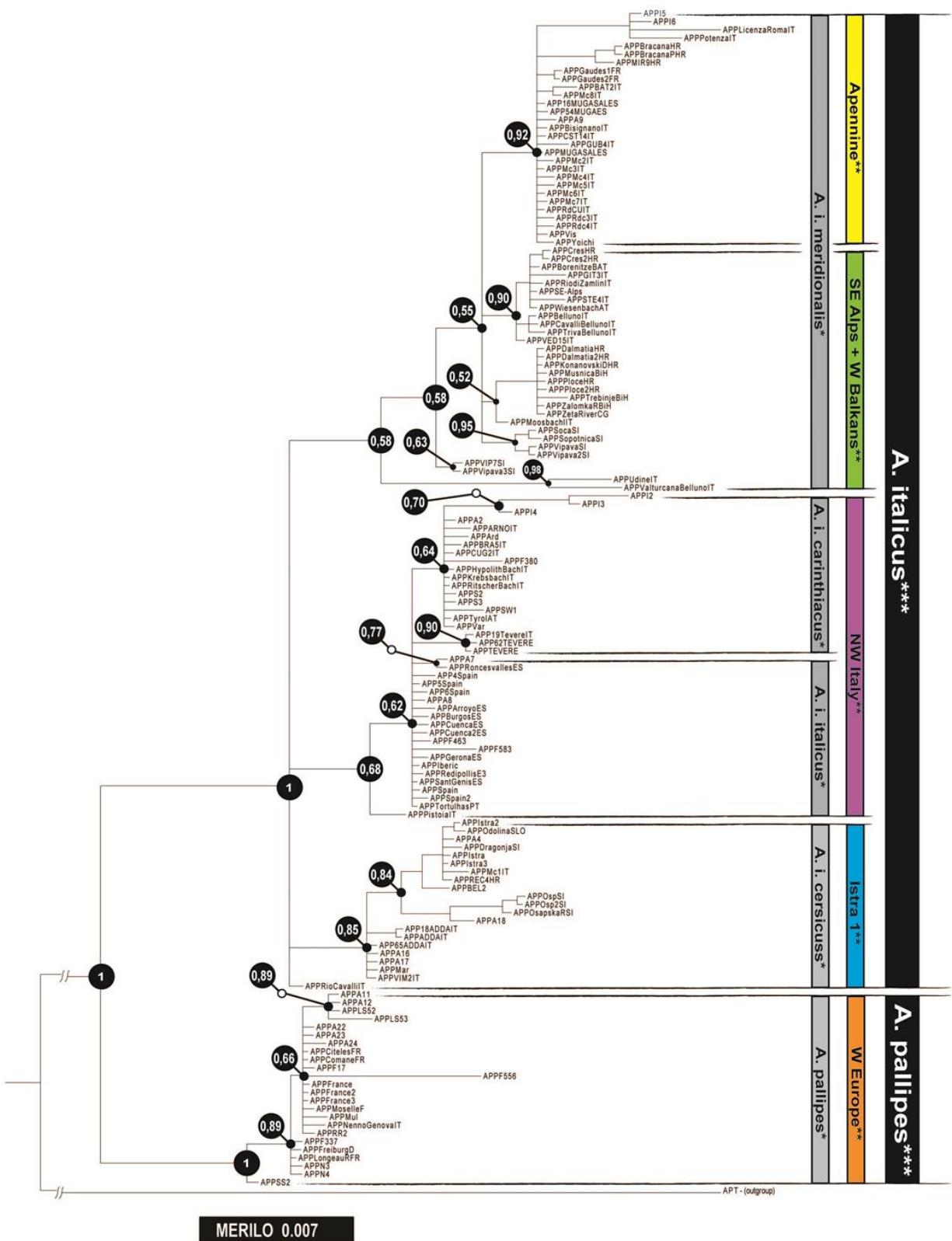
Slika 7: Bayesov filogram za takson *A. pallipes* sensu lato na podlagi lokusa CO1. Številke v vozliščih prikazujejo posteriorne verjetnosti. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami (merilo). Na desni strani haplotipske skupine/vrste (**Trontelj in sod., 2005; ***ta raziskava).

Figure 7: Bayesian phylogram of *A. pallipes* sensu lato inferred from gene CO1. Numbers at nodes indicate Bayesian posterior probabilities. Haplotype groups/species represented on right (**Trontelj et al., 2005; ***this study).



Slika 8: Bayesov filogram za takson *A. pallipes* sensu lato na podlagi nDNA ITS2. Številke v vozliščih prikazujejo posteriorne verjetnosti v deležih. Dolžine vej ustrezajo genetski razdalji (merilo). Ob desnem robu so označene delitve na vrste (***)ta raziskava).

Figure 8: Phylogram of *A. pallipes* sensu lato inferred from gene ITS2 with Bayes statistics. Numbers at nodes indicate Bayesian posterior probabilities. On right side are represented clade/species names (*** results for this study).



Slika 9: Bayesov filogram za takson *A. pallipes* sensu lato na podlagi združenih zaporedij. Številke v vozliščih prikazujejo posteriorne verjetnosti. Dolžine vej ustrezajo genetski razdalji (merilo). Ob desnem robu so označene delitve na vrste/haplotske skupine (*Grandjean in sod., 2002; Fratini in sod., 2005) (**Trontelj in sod., 2005) (***)ta raziskava).

Figure 9: Bayesian phylogeny for *A. pallipes* sensu lato inferred from concatenated sequences. On the left are represented haplogroups/species name (*Grandjean in sod., 2002; Fratini in sod., 2005) (**Trontelj in sod., 2005) (**this study).

4.1.2.2 Določanje hipotetičnih vrst z metodami za razmejitev vrst na osnovi DNA

Z metodami za razmejitev vrst na osnovi DNA (ABGD in PTP) smo postavili primarno hipotezo o številu vrst (PSHs). ABGD in PTP analize smo izvedli z naslednjimi genskimi označevalci:

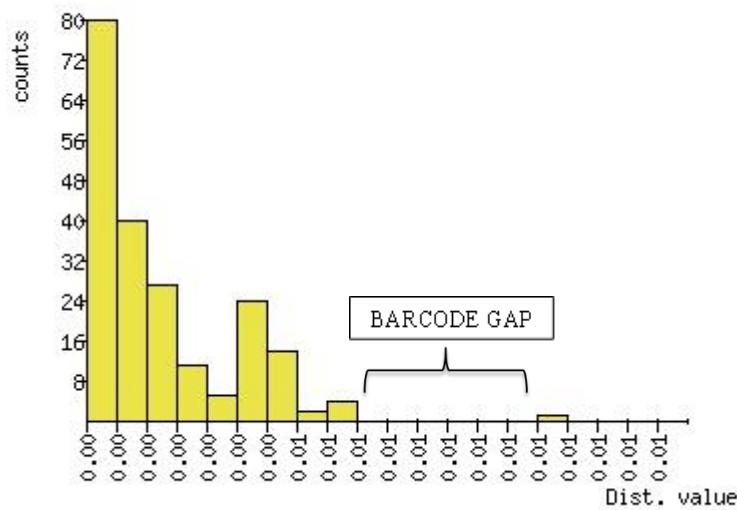
- Analiza odseka gena CO1,
- Analiza odseka zaporedja ITS2,
- Analiza odseka gena 16S (neuspešno),
- Kombinacija obeh mitohondrijskih genov 16S in CO1 (neuspešno).

Z analizo jedrnega lokusa ITS2 smo določili dve hipotetični vrsti. Z analizami mitohondrijskega genoma (lokus CO1) smo določili pet skupin, ki se ujemajo z našimi filogenetskimi analizami.

ABGD analiza

Za takson *A. pallipes* se je najbolje obnesla analiza z metodo ABGD na osnovi jedrnega zaporedja ITS2, kjer smo pri vrednostih $P = 0.0015$ dobili vrzel (Slika 10) in dve jasni skupini, ki v navezi s preostalimi filogenetskimi analizami predstavljata hipotetični vrsti *A. pallipes* sensu stricto in *A. italicus*:

- Skupina 1 (18 zaporedij ITS2): Dragonja1SLO, RioTriva2IT, HypolithBachIT, Dragonja2SLO, Vipava_SLO, RitscherBIT, TortulhasP, KonavovskiDHR, SopotnicaSLO, OsapskaRSLO, BorenitzeBA, BracanaPHR, KrebsbachIT, MusnicaBiH, RioTriva1IT, RioCavalliIT, RiodiZamlinIT, ZetaRiverCG. → ustreza taksonu *A. italicus*,
- Skupina 2 (3 zaporedja ITS2): Ruisseau.d.Moulin.d.AdresF, ComaneF, CitellesF → ustreza taksonu *A. pallipes* sensu stricto.



Slika 10: Graf analize ABGD za sekvence ITS2 za takson *A. pallipes* sensu lato. Vrzel je označena kot »barcode gap«. Distančna razdalja (označena kot Dist. value) ustreza genetski razdalji za K2P evolucijski model.

Figure 10: Graph ABGD analyses for ITS2 sequences for taxon *A. pallipes* with barcode gap. Distance Value (represented as Dist. value) corresponds to genetic distance for K2P evolutionary model.

Graf analize ABGD za zaporedja CO1 je sicer brez vrzeli, vendar so haplotipi, kot pri analizi zaporedij ITS2, bili razvrščeni v dve skupini: eno skupino zastopata haplotipa APP_Nenno-Genova_I in APP_France (hipotetičen takson *A. pallipes* sensu stricto), drugo pa preostale (hipotetičen takson *A. italicus*). Pri vrednosti $P = 0.014$ so haplotipi razvrščeni v šest skupin, pri čemer so štiri od teh v navezavi z ostalimi filogenetskimi analizami in ustrezajo naslednjim haplotipskim skupinam:

- Skupina 1 (n=35): MUGA_SAL_5, APP_CST14, APP-RdC_U_1, APP-RdC4, APP_Yoichi, APP_Gaudes_6, APP-RdC3, APP_GUB4, APP_BAT2, APP_Bracana1, APP_MIR9, APP_ZalomkaR_BiH, APP_Dalmatia, APP_Ploce, APP_Trebinje, APP_Moosbachl, APP_Wiesenbach, APP_SEAlps, APP_Cres, APP_GIT3, APP_Belluno, APP_VED15, APP_STE4, APP_Soca, APP_Sopotnica, APP_Vipava, APP_VIP7, APP_Villa_dAgri-Potenza,_I Mc4_IT, Mc3_IT, Mc2_IT, Mc8_IT, Mc5_IT, Mc6_IT, Mc7_IT → ustreza skupini **SE Alps + W Balkans in Apennine;**

- Skupina 2 (n=16) : Cuenca, APP_SPAIN_3, SPAIN_7, Gerona, APP_Iberic_4, APP_Tyrol_2, APP_CUG2, APP_BRA5, 5_SPAIN, Cuenca-2, Burgos-2, 6_SPAIN, 4_SPAIN, 19_TEVERE, APP_Pistoia_I, 1_ARNO → ustreza skupini **NW Italy**;
- Skupina 3 (n=35): APP_Dragonja, APP_Istria, APP_REC4, APP_BEL2, APP_VIM2, 18_ADDA, Mc1_IT → ustreza skupini **Istra 1**;
- Skupina 4 (n=2): APP_Nenno-Genova_I, APP_France → ustreza skupini **W Europe**.

Preostali dve CO1 skupini, skupina 5 (haplotip APP_Licenza-Roma_I) ter skupina 6 (haplotip APP_Rio_Valturcana-Belluno_I in APP_Udine_I), odstopata po vsej verjetnosti zaradi kratkega CO1 zaporedja 399 bp (avtorji Chiesa in sod., 2011), medtem ko so preostala zaporedja bila dolga v povprečju 600 bp.

PTP analiza

Z metodo PTP za lokus ITS2 za takson *A. pallipes* sensu lato smo dobili enak rezultat kot z metodo ABGD. Topologija izračunanega bPTP drevesa jasno razmejuje dve skupini, ki ju lahko opredelimo kot hipotetični vrsti *A. pallipes* sensu stricto in *A. italicus*:

- Skupina 1 (18 zaporedij): RioCavalliIT, ZetaRiverCG, RitscherBIT, RioTriva1IT, KrebsbachIT, SopotnicaSLO, KonavovskiDHR, TortulhasP, Vipava_SLO, Dragonja2SLO, HypolithBachIT, RioTriva2IT, Dragonja1SLO, BorenitzeBA, RiodiZamlinIT, MusnicaBiH, OsapskaRSLO, BracanaPHR → ustreza taksonu *A. italicus*,
- Skupina 2 (3 zaporedja): CitellesF, Ruisseau.d.Moulin.d.AdresF, ComaneF → ustreza taksonu *A. pallipes* **sensu stricto**.

Rezultat analize CO1 zaporedij z metodo PTP prikazuje sedem potencialnih taksonomskih skupin, od katerih jih je pet v skladu z analizo ABGD in s preostalimi filogenetskimi raziskavami.

- Skupina 1: APP_Nenno-Genova_I, APP_France → ustreza skupini **W Europe**,

- Skupina 2: MUGA_SAL_5, APP_CST14, APP-RdC_U_1, APP-RdC4, APP_Yoichi, Mc3_IT, Mc6_IT, Mc5_IT, Mc7_IT, Mc2_IT, APP_BAT2, Mc8_IT, APP-RdC3, Mc4_IT, APP_GUB4, APP_Villa_dAgri-Potenza_I, APP_Licenzia-Roma_I, APP_Gaudes_6, APP_Bracana1, APP_MIR9, APP_Sopotnica, APP_Soca, APP_Vipava, APP_Dalmatia, APP_Ploce, APP_ZalomkaR_BiH, APP_Trebinje, APP_VIP7, APP_Moosbachl, APP_Belluno, APP_VED15, APP_GIT3, APP_STE4, APP_Wiesenbach, APP_SEAlps, APP_Cres → ustreza skupini **SE Alps + W Balkans in Apennine**,
- Skupina 3: APP_Pistoia_I, APP_BRA5, APP_Tyrol_2, APP_CUG2, 1_ARNO, 4_SPAIN, Cuenca, APP_SPAIN_3, SPAIN_7, Gerona, APP_Iberic_4, 5_SPAIN, Cuenca-2, Burgos-2, 6_SPAIN, 19_TEVERE → ustreza skupini **NW Italy**
- Skupina 4: APP_VIM2,18_ADDA → ustreza delu skupine **Istra 1**,
- Skupina 5: APP_BEL2,Mc1_IT, APP_Dragonja, APP_Istria, APP_REC4 → ustreza delu skupine **Istra 1**.

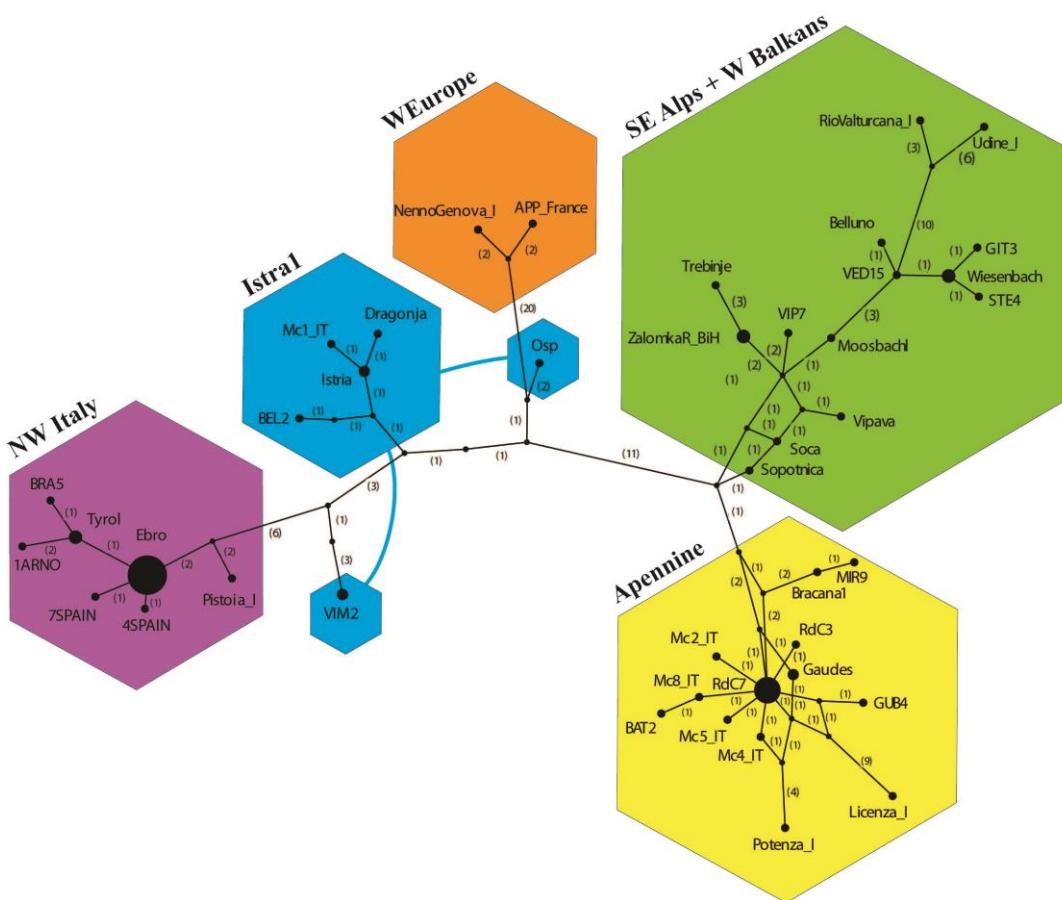
Iz analize sta izstopali sekvenci APP_Rio_Valturcana-Belluno_I in APP_Udine_I, avtorjev Chiesa in sod. (2011), verjetno zaradi kratkega zaporedja (399 bp), kar je po našem mnenju napaka zaradi kratkega CO1 zaporedja 399 bp, medtem ko je večina analiziranih zaporedij bilo dolgih približno 600 bp.

Za obe metodi smo preizkusili tudi analizo zaporedij 16S rDNA ter združenih mtDNA zaporedij (CO1+16S), vendar so rezultati bili precej nejasni (veliko skupin z nizkimi podporami), zato smo se odločili, da rezultatov ne uporabimo.

4.1.2.3 Filogeografska obravnava taksona *A. pallipes*

Analiza z metodo MJN je bila izvedena na 399 bp dolgih zaporedjih CO1 (42 unikatnih haplotipov). Oznake identičnih haplotipov CO1 za metodo MJN za takson *A. pallipes* sensu lato so prikazane v Prilogi C.

Kljub krajšim CO1 zaporedjem analiza z metodo MJN razkriva pet ločenih filogeografskih skupin (Slika 11), ki sovpadajo s skupinami, ki smo jih potrdili tudi v preostalih filogenetskih analizah. Ker filogeografske skupine delno sovpadajo s haplotipskimi skupinami, ki so jih v raziskavi iz leta 2005 opredelili Trontelj in sod., smo imena povzeli: haplotipska skupina W Europe, haplotipska skupina NW Italy, haplotipska skupina SE Alps + W Balkans, haplotipska skupina Apennine in haplotipska skupina Istria1. Vse haplotipske skupine so ločene s precejšnjim številom mutacij, opazno manj mutacij je med skupinama SE Alps + W Balkans in Apennine, kjer je tudi največ »zamreženih« odnosov (mediani vektorji). Znotraj skupin, torej med sosednjimi haplotipi, je bilo število mutacij nizko (1 do 2 mutaciji), pri čemer so s precejšnjim številom mutacijskih korakov (med 3 in 9) izstopali haplotipi avtorjev Chiesa in sod. (2011): Potenza_I, Licenza_I, RioValturgana_I, Udine_I. Te sekvene so izstopale tudi v ostalih filogenetskih analizah. Haplotipske skupine Istra2, ki jo navajajo Trontelj in sod. (2005) nismo potrdili. V naši analizi so ti haplotipi vključeni v haplotipsko skupino Apennine.

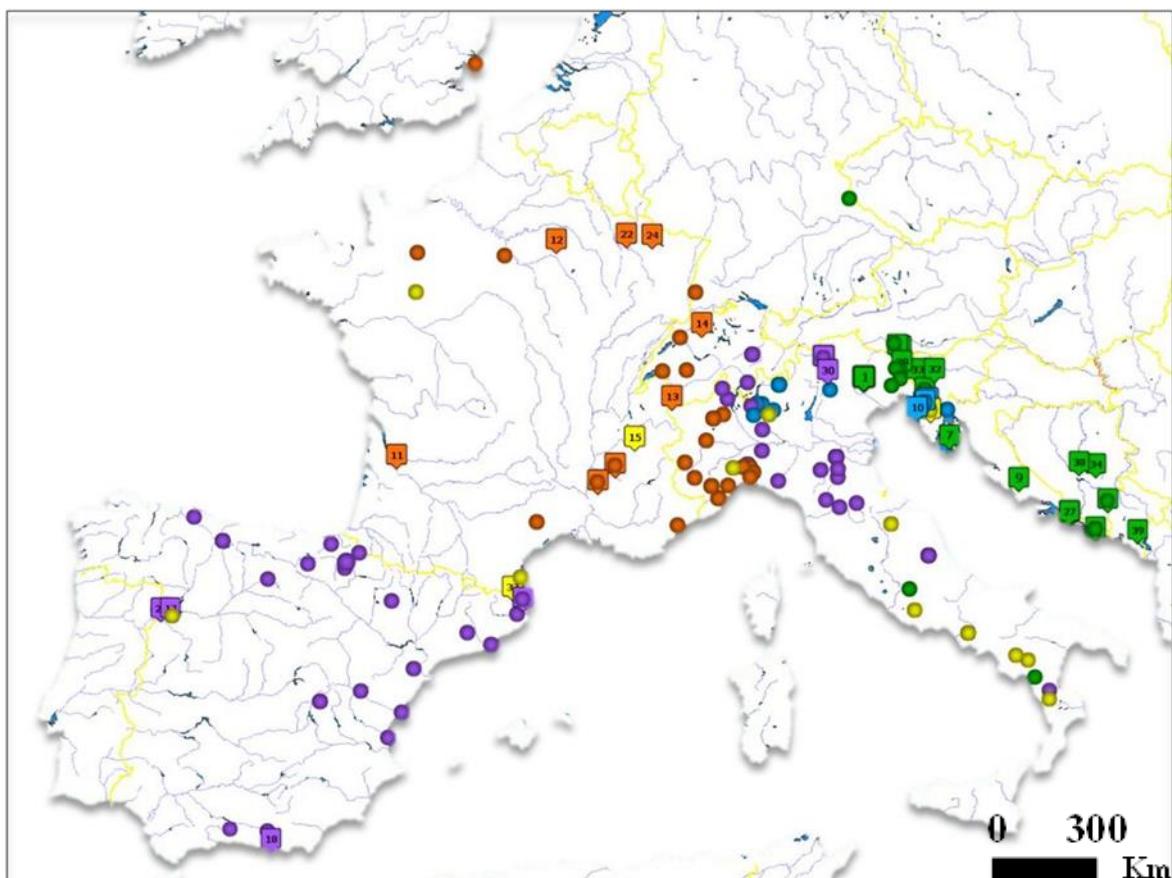


Slika 11: Analiza z metodo MJN za takson *A. pallipes* sensu lato (lokus CO1). Velikost krogov ustreza frekvenci haplotipov združenih pod istim imenom. Prikazanih je pet identificiranih filogeografskih skupin: W Europe (oranžno), NW Italy (vijolično), SE Alps + W Balkans (zeleno), Apennine (rumeno) in Istria1(modro). Številke v oklepajih prikazujejo število nukleotidnih substitucij.

Figure 11: MJN analyses (gene CO1) for *A. pallipes* sensu lato. Five phylogeographical group were identified: W Europe (orange), NW Italy (purple), SE Alps + W Balkans (green), Apennine (yellow) in Istria1(blue). Numbers in brackets represent amount of substitutions.

Glede na rezultate filogenetskih analiz (metoda BI na osnovi združenih lokusov, MJN) in metod za razmejitev vrst (ABGD in PTP) smo haplotipe razvrstili v dva klada, ki ju opredeljujemo kot hipotetični vrsti *A. pallipes* sensu stricto in *A. italicus*, ter pet filogeografskih skupin: SE Alps+W Balkans, Apennine, NW Italy, Istra 1 in W Europe. Na zemljevidu Evrope smo s programoma GoogleEarth in GoogleMaps prikazali lokacije analiziranih haplotipskih skupin (Slika 12). Klad 1 (ustreza vrsti *A. pallipes* sensu stricto) je predstavljen z oranžno barvo, klad 2 (ustreza vrsti *A. italicus*) pa z rumeno, zeleno, modro in vijolično. Oba klada imata dokaj specifično geografsko razporeditev: klad 1 je

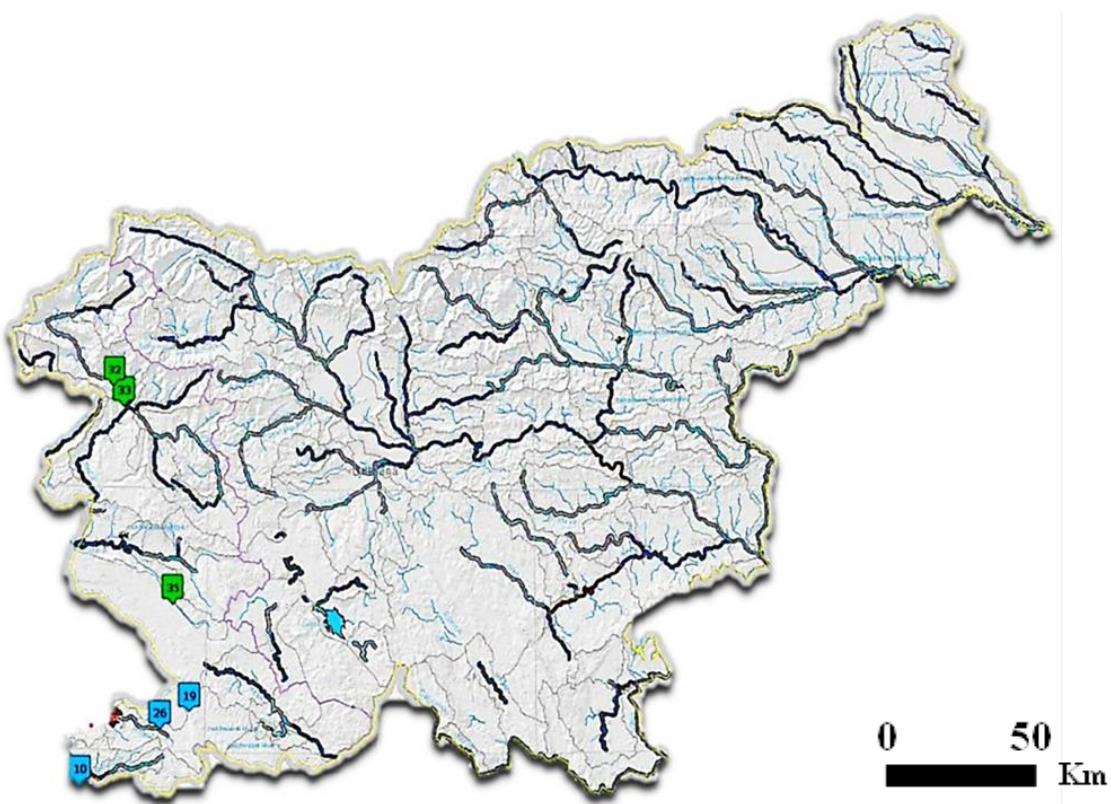
razširjen v porečjih zahodne Evrope, klad 2 pa v porečjih centralne Evrope ter na Apeninskem, Pirenejskem in Balkanskem polotoku. Oba klada sobivata (simpatrija) samo na področju severne Italije.



Slika 12: Zemljevid razporeditve filogeografskih skupin za takson *A. pallipes* sensu lato. S številkami so označena naši vzorci (podrobnejši opis vzorcev je naveden v Preglednici 2), vzorci iz GeneBank so točkovno prikazani (podrobnosti so v Prilogi A). Barvna legenda prikazuje haplotipske skupine in klad: oranžna (klad *A. pallipes* sensu stricto; haplotipska skupina W Europe), zelena (klad *A. italicus*; haplotipska skupina SEAlps +W Balkans), rumena (klad *A. italicus*; haplotipska skupina Apennine), vijolična (klad *A. italicus*; haplotipska skupina NW Italy), modra (klad *A. italicus*; haplotipska skupina Istra1).

Figure 12: Map of distribution of phyletic groups for taxon *A. pallipes* sensu lato. Samples of other Authors are included. For a detailed description see Table 2 and Supplementary A. Colour legend represents haplogroup and clad: orange (clad *A. pallipes* sensu stricto; haplogroup W Europe), green (clad *A. italicus*; haplogroup SEAlps +W Balkans), yellow (clad *A. italicus*; haplogroup Apennine), purple (clad *A. italicus*; haplogroup NW Italy), blue (clad *A. italicus*; haplogroup Istra1).

Proučevane slovenske populacije pripadajo kladu *A. italicus*, filogeografskima skupinama Istra 1 ter SE Alps + WBalkans (Slika 13).



Slika 13: Zemljevid rasporeditve filogeografskih skupin za takson *A. pallipes* sensu lato v Sloveniji. Podrobnejši opis vzorcev je naveden v Preglednici 2. Barvna legenda prikazuje haplotipske skupine in klad: zelena (klad *A. italicus*; haplotipska skupina SEALps +W Balkans), modra (klad *A. italicus*; haplotipska skupina Istra1).

Figure 13: Map of distribution of phyletic groups for taxon *A. pallipes* sensu lato for Slovenia. For a detailed description see Table 2. Colour legend represents haplogroup and clad: green (clad *A. italicus*; haplogroup SEALps +W Balkans), blue (clad *A. italicus*; haplogroup Istra1).

4.1.3 Takson *A. torrentium*

4.1.3.1 Filogenetske analize taksona *A. torrentium*

Evolucijski modeli za DNA zaporedja taksona *A. torrentium*, ki so glede na AICc kriterij najbolje opisali potek substitucij za posamezne lokuse, so prikazani v Preglednici 6.

Preglednica 6: Evolucijski model za posamezne DNA lokuse za takson A. torrentium. Evolucijski modeli: GTR - splošni časovno reverzibilni model nukleotidne substitucije; HKY - Hasagawa Kishino Yano; TN93 - Tamura-Nei; Γ - gamma distribucija; I - nespremenljiva mesta.

Table 6: Evolutionary models for analysed DNA locuses for A. torrentium. Substitution models: GTR - general time reversible; HKY - Hasagawa Kishino Yano, TN93 - Tamura-Nei; Γ - gamma distribution; I - invariable sites.

Lokus	Evolucijski model
CO1	HKY+ Γ +I
16S rDNA	HKY + Γ +I
ITS2	HKY

Izvedli smo filogenetske analize z metodama ML in BI na posameznih lokusih (CO1, 16S in ITS2 ter na združenih sekvenkah). V nadaljevanju so prikazana filogenetska drevesa, izrisana z Bayesovim pristopom (Slike 14, 15, 16, 17). Topologije filogenetskih drevesih za mtDNA ter za združene lokuse imajo precej različno bazalno topologijo, kljub temu je razvidno razporejanje haplotipov v 8 filogeografskih skupin. Ker je večina skupin sovpadala s skupinami, ki so jih v filogenetski raziskavi določili Klobučar in sod. (2013), smo določena imena povzeli: Zeleni Vir (ZV), Kolpa, Lika in Dalmatia (LD), Banovina (BAN), Žumberak, Plitvice in Bjelolasica (ŽPB), Southern Balkans (SB), Central and South-Eastern Europe (CSE) in CSE*. Vse haplotipske skupine iz severo-centralnih Dinaridov (ZV, Kolpa, LD, BAN, ŽPB) tvorijo monofiletske klade z dokaj visoko podporo ($p_v > 0.75$), vendar so filogenetski odnosi med njimi ostali nerazrešeni zaradi neenotne bazalne topologije (neenotno razvejani kladi) med vsemi ocjenjenimi filogenetskimi drevesi. Za klade SB, CSE in CSE* nismo podprli monofiletskega izvora z vsemi analiziranimi zaporedji DNA, klada SB in CSE sta izrazito politomna. Klad CSE* smo v naši raziskavi (ki ga zastopajo haplotipi Kladanj_BiH (oznaka za zaporedja 16S rDNA: CSEUROPE_9), LimR(CG), TaraR(CG), in CSE_2 (oznaka za zaporedja 16S rDNA: CSEEUROPE_9; oznaka za zaporedja CO1: CSE_2; oznaka za zaporedja združena 16S in CO1: CSEEurope_2)), pa zavzema precej nejasen filogenetski položaj: v filogenetskih drevesih na osnovi analiz mtDNA je ta skupina prikazana kot parafiletska s haplotipi skupine CSE, ko pa mtDNA dodamo še jedrno informacijo (zaporedja ITS2), ti haplotipi iz območja Črne Gore ter Bosne in Hercegovine tvorijo monofiletsko skupino, ki je bliže skupinam iz osrednjega Balkana (ZV, Kolpa, LD, BAN, ŽPB); dihotomija skupine CSE* z vejo za skupine iz severno centralnih Dinaridov je relativno visoko podporta ($p_v = 0.86$).

Najslabše podprto drevo je na osnovi zaporedij mtDNA 16S rDNA in kaže politomijo na tri bazalne linije (SB + CSE +CSE*, ŽPB + LD + ZV + Kolpa, BAN), podpore tem

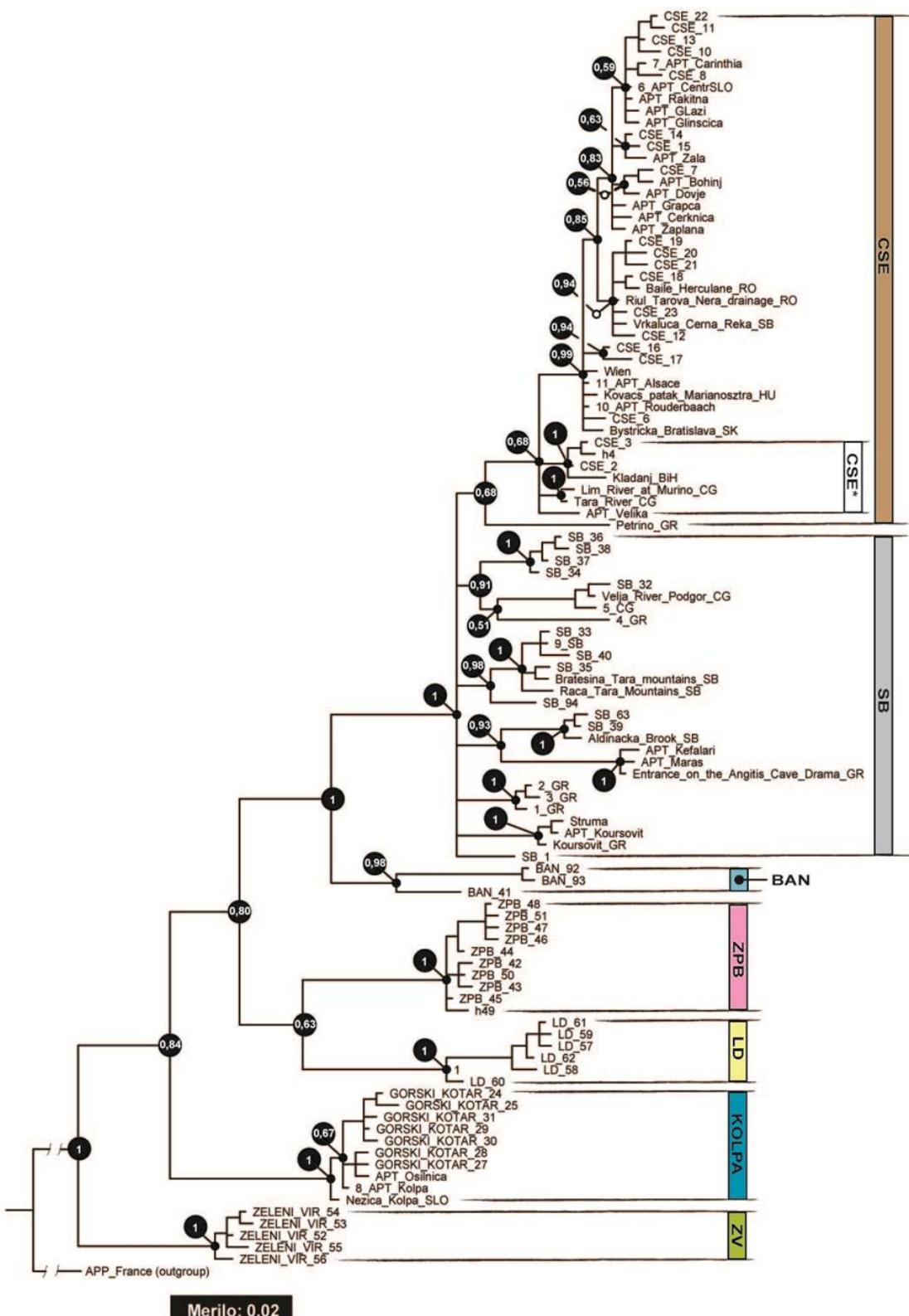
skupinam so nizke ($pv < 55$), znotraj skupin je precej nerazrešenih odnosov, predvsem parafilija skupin SB, CSE in CSE*.

Drevo na osnovi združenih zaporedij jedrnih in mitohondrijskih zaporedij prikazuje edinstveno topologijo z visoko podprtimi kladi ($pv > 0.86$), razen ene razvejitve znotraj skupin iz osrednjega Balkana ($pv = 0.65$ za razvejitev med kladi Kolpa, ZV in ŽPB). V tem drevesu so vsi omenjeni kladi monofletski. Eno evolucijsko linijo predstavlja monofletska klada CSE in SB ter haplotip Velika_TR, v drugi evolucijski liniji pa si hierarhično sledijo kladi CSE*, BAN, LD, ŽPB, ZV ter Kolpa. Veje kladov iz centralnega Balkana so izrazito dolge v primerjavi z ostalimi in kažejo na velike genetske razdalje, pravtako smo med temi kladi ocenili velik evolucijski razhod ($p\text{-razdalja} > 0.07$) in jih lahko (v primerjavi s $p\text{-razdaljami}$ za taksona *A. pallipes* in *A. italicus*) opredelimo kot hipotetične kriptične vrste. Vsi kladi iz centralnih Dinaridov so striktno alopatrični, o čemer so poročali tudi Klobučar in sod. (2013).

Zanimiv je položaj haplotipa Velika_TR, ki v primeru filogenetskih analiz posamičnih mtDNA genov pripada skupini CSE* (s sicer nizko podporo $pv < 0.65$), v analizi združenih lokusov pa kaže politomijo s skupinama CSE in SB.

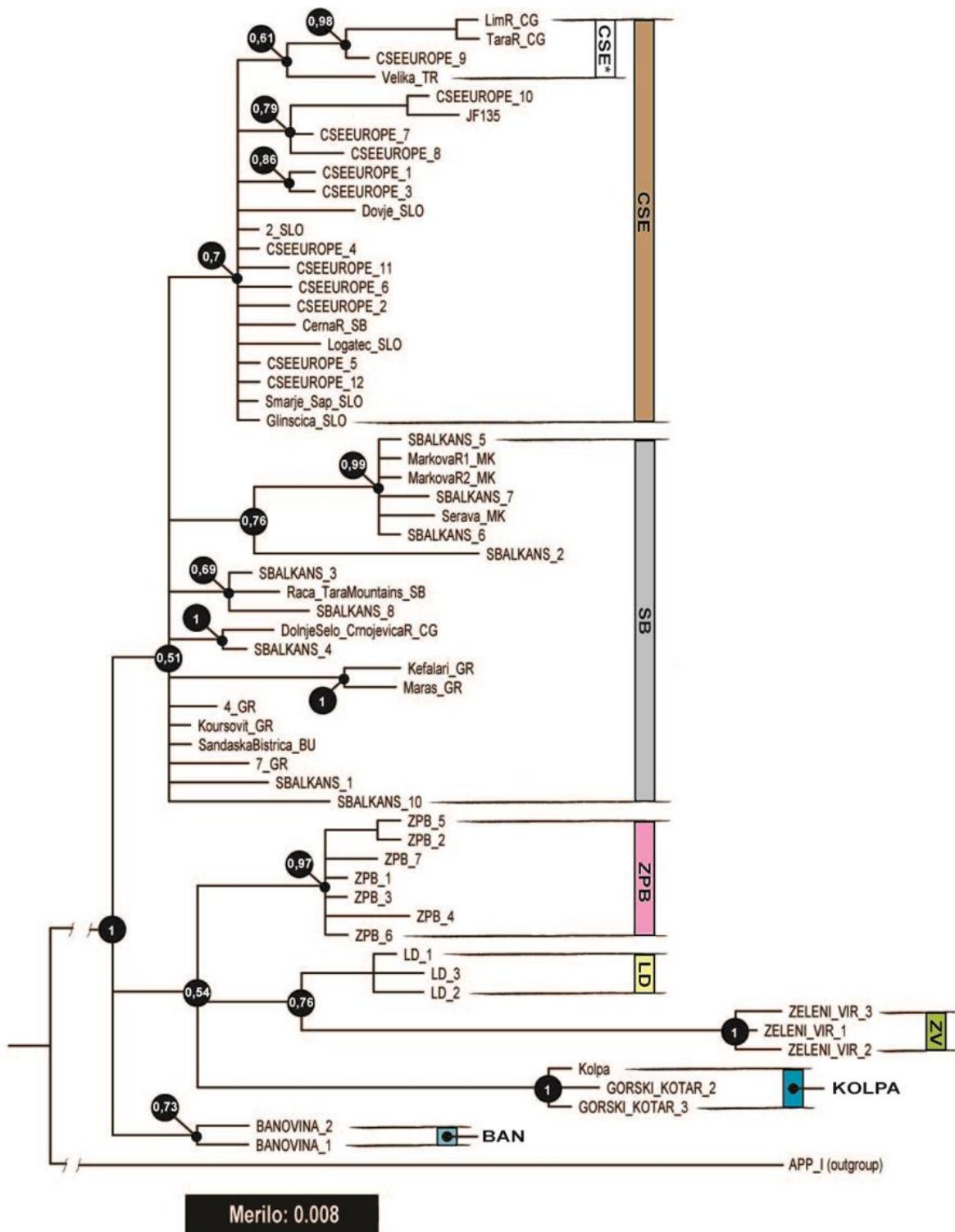
Filogenetsko drevo na osnovi jedrnega lokusa ITS2 ima izrazito bazalno politomijo, razločimo lahko velik evolucijski razhod med haplotipi iz Kolpe (Slo), Osilnice (Slo), Grivački Potok (Slo) in Kladnja (Kladanj_BiH ter Lim(CG)), ter ostalimi haplotipi iz skupin CSE in SB. Iz tega lahko sklepamo, da med populacijami iz severno-centralnih Dinaridov (kladi Kolpa, ZV, ŽPB, BAN in LD) in populacijami iz severnega poselitvenega območja taksona *A. torrentium* (kladi SB in CSE) ni genetskega pretoka. Žal smo za analize jedrne DNA, zaradi težavne izolacije, imeli najmanj zaporedij (42), manjkali so nam tudi vzorci iz filetskih linij ŽPB, BAN, ZV in LD. Za podrobnejšo analizo sorodstvenih odnosov predlagamo nadaljne analize odsekov jedrnega genoma.

Opazna je tudi razlika v genetski raznolikosti posameznih skupin. Medtem ko so kladi iz severocentralnih Dinaridov genetsko zelo heterogeni in imajo dolge veje, sta klada SB in CSE genetsko manj raznolika.



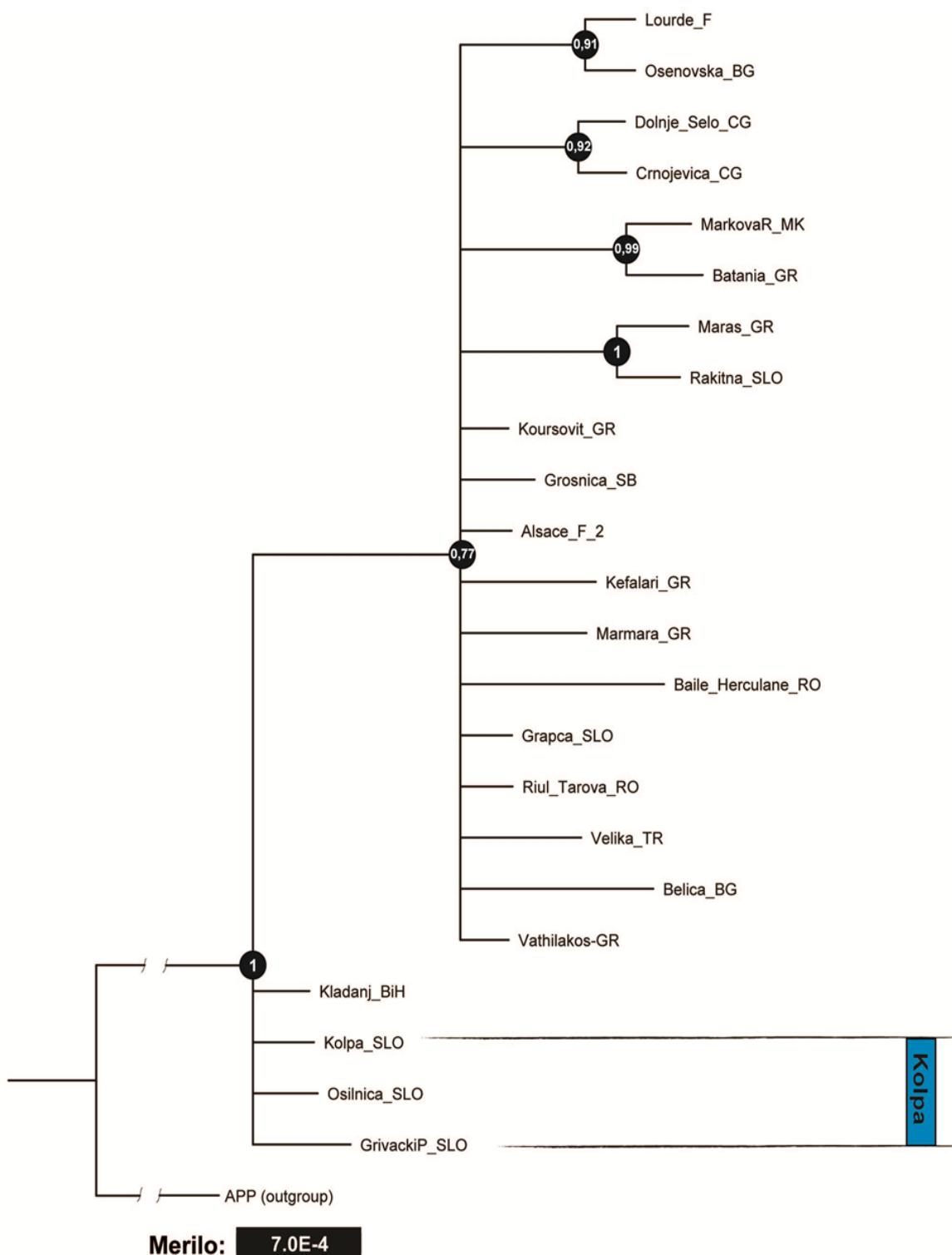
Slika 14: Bayesov filogram za takson *A. torrentium* na podlagi lokusa CO1. Številke v vozliščih prikazujejo posterjorne verjetnosti v deležih. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami (merilo). Ob desnem robu so označene haplotipske skupine (Klobučar in sod., 2013; *ta raziskava).

Figure 14: Bayesian phylogram of *A. torrentium* inferred from gene CO1 with Bayes statistics. Numbers at the nodes indicate Bayesian posterior probabilities. Haplotype groups represented on right (Klobučar et al., 2013; *this study).



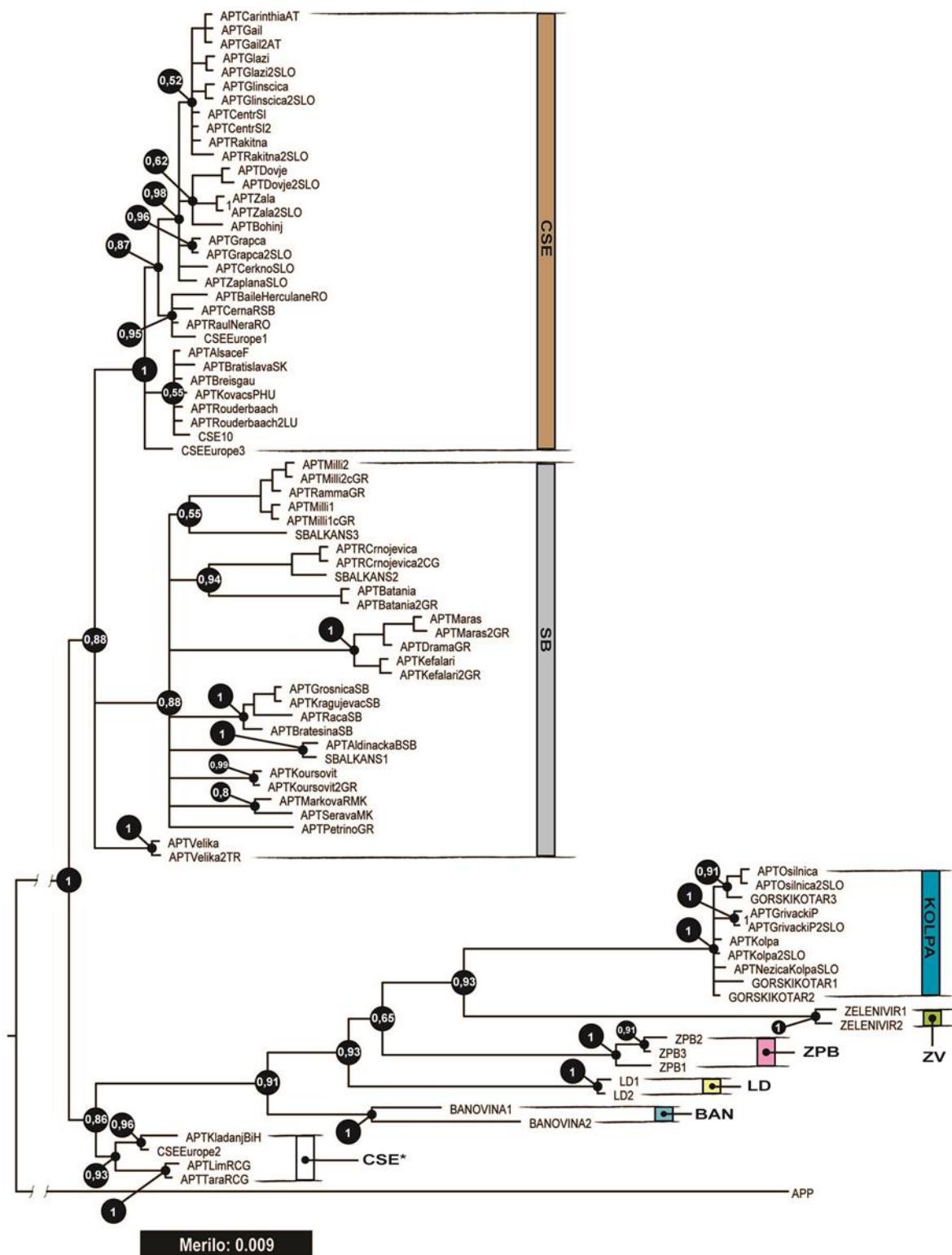
Slika 15: Bayesov filogram za takson *A. torrentium* na podlagi lokusa 16S rDNA. Številke v vozliščih prikazujejo posteriorne verjetnosti v deležih. Dolžine vej so sorazmerne z genetskimi razdaljami (merilo). Ob robu so označene haplotipske skupine (Klobučar in sod., 2013; *ta raziskava).

Figure 15: Bayesian phylogram of *A. torrentium* inferred from gene 16S rRNA with Bayes statistics. Numbers at the nodes indicate Bayesian posterior probabilities. Haplotype groups representet on right (Klobučar et al., 2013; *this study).



Slika 16: Bayesian filogram za takson *A. torrentium* na podlagi lokusa ITS2. Številke v vozliščih prikazujejo posterjorne verjetnosti v deležih. Dolzine vej ustrezajo genetski razdalji (merilo). Ob desnem robu je označena haplotipska skupina Kolpa.

Figure 16: Bayesian phylogram of *A. torrentium* inferred from gene 16S rRNA with Bayes statistics. Numbers at the nodes indicate Bayesian posterior probabilities. Haplotype groups representet on right.



Slika 17: Bayesov filogram za takson *A. torrentium* na podlagi združenih lokusov. Številke v vozliščih prikazujejo posterjorne verjetnosti v deležih. Dolžine vej ustrezajo genetski razdalji (merilo). Ob desnem robu so označene haplotipske skupine. (Klobučar in sod., 2013; *ta raziskava).

Figure 17: Bayesian phylogeny for taxon A. *torrentium* inferred from concatenated locuses. Numbers at the nodes indicate Bayesian posterior probabilities. Haplotype groups represented on right (Klobučar et al., 2013; *this study).

4.1.3.2 Analiza števila hipotetičnih vrst z metodami za razmejitve vrst na osnovi DNA

S pomočjo metod za razmejitve vrst na osnovi DNA zaporedij smo določili hipotetične vrste. ABGD in PTP analize smo izvedli z naslednjimi genskimi označevalci:

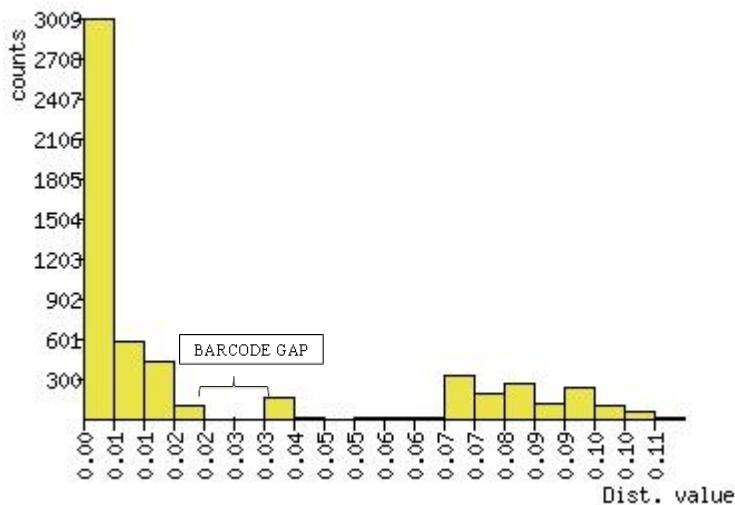
- Analiza odseka gena CO1,
- Analiza odseka zaporedja ITS2 (neuspešno)
- Analiza odseka gena 16S (neuspešno),
- Kombinacija obeh mitohondrijskih genov 16S in CO1 (neuspešno).

Analiza ABGD

Najbolje se je obnesla analiza CO1 zaporedja, kjer smo doobile vrzel (angl. barcode gap) (Slika 18) ter šest skupin, ki so v skladu z ostalimi filogenetskimi analizami, z razliko, da so skupine CSE, CSE* in SB združene v eno skupino:

- Skupina 1: ZPB_42, ZPB_50, ZPB_43, ZPB_45, ZPB_44, h49, ZPB_48, ZPB_51, ZPB_47, ZPB_46 → ustreza skupini **ŽPB** (Klobučar in sod., 2012),
- Skupina 2: LD_60, LD_58, LD_62, LD_61, LD_59, LD_57 → ustreza skupini **LD** (Klobučar in sod., 2013),
- Skupina 3: GORSKI_KOTAR_31, GORSKI_KOTAR_29, GORSKI_KOTAR_24, GORSKI_KOTAR_30, GORSKI_KOTAR_25, GORSKI_KOTAR_28, GORSKI_KOTAR_27, APT_Osilnica, Nezica_Kolpa_SLO, 8_APT_Kolpa → ustreza skupini **Kolpa** (**GK**-Gorski Kotar, Klobučar in sod., 2013),
- Skupina 4: ZELENI_VIR_56, ZELENI_VIR_52, ZELENI_VIR_54, ZELENI_VIR_5,3 ZELENI_VIR_55 → ustreza skupini **ZV** (Klobučar in sod., 2013),
- Skupina 5: BAN_41, BAN_92, BAN_93 → ustreza skupini **BAN** (Klobučar in sod., 2013),
- Skupina 6: SB_94 SB_35, Bratesina_Tara_mountains_SB, SB_33, 9_SB, SB_40, Raca_Tara_Mountains_SB. SB_34, SB_37, SB_36, SB_38, SB_1, 1_GR, 2_GR ,3_GR, Struma, APT_Koursovít, Koursovít_GR, SB_32, Velja_River_Podgor(CG,

5_CG, CSE_18, Riul_Tarova_Nera_drainage_RO, CSE_23, CSE_19, Vrkaluca_Cerna_Reka_SB, Baile_Herculane_RO, CSE_20, CSE_16, Wien, 11_APT_Alsace, Kovacs_patak_Marianosztra_HU, 10_APT_Rouderbaach, CSE_6, Bystricka_Bratislava_SK, CSE_14, CSE_15, APT_Grapca, APT_Zala, CSE_22, CSE_13, CSE_11, 6_APT_CentrSLO, APT_Rakitna, APT_GLazi, APT_Glinscica, 7_APT_Carinthia, APT_Cerknica, CSE_8, CSE_7, APT_Bohinj, APT_Dovje, APT_Zaplaa, CSE_12, CSE_21, CSE_10, CSE_17, CSE_2, CSE_3,h4, Kladanj_BiH, Lim_River_at_Murino(CG, Tara_River(CG, APT_Velika, SB_63, SB_39, Aldinacka_Brook_SB. 4_GR, APT_Kefalari, APT_Maras_Entrance_on_the_Angitis_Cave_Drama_GR, Petrino_GR. → ustreza skupinam CSE, SB in CSE*.



Slika 18: Graf analize z metodo ABGD analize za sekvence CO1 za takson *A. torrentium*. Vrzel je označena kot »barcode gap«. Distančna razdalja (angl. Dist. value) ustreza genetski razdalji za K2P evolucijski model.

Figure 18: Graph ABGD analyses for CO1 sequences for taxon *A. torrentium* with barcode gap. Distance Value corresponds to genetic distance for K2P evolutionary model.

Analiza PTP

Rezultati PTP analiz so precej nejasni, rezultati za sekvence 16S rDNA in kombinacijo CO1 in 16S so neuporabni. Z analizi lokusa CO1 smo dobili 24 skupin, 19 skupin je bilo

precej razdrobljenih, 8 skupin je zastopal en sam haplotip. Navajamo pet skupin, ki so v korelaciji z ostalimi filogenetskimi analizami:

- Skupina 1: ZELENI_VIR_55, ZELENI_VIR_56, ZELENI_VIR_52, ZELENI_VIR_54, ZELENI_VIR_53 → ustreza skupini **ZV**,
- Skupina 2: GORSKI_KOTAR_24, GORSKI_KOTAR_25, GORSKI_KOTAR_29, GORSKI_KOTAR_30, GORSKI_KOTAR_31, Nezica_Kolpa_SLO, 8_APT_Kolpa, GORSKI_KOTAR_28 GORSKI_KOTAR_27, APT_Oslnica → ustreza skupini **Kolpa**,
- Skupina 3: LD_61, LD_59, LD_57, LD_62, LD_58 → ustreza skupini **LD**,
- Skupina 4: CSE_22, CSE_11, CSE_13, CSE_10, APT_Glinscica, APT_GLazi, 6_APT_CentrSLO, APT_Rakitna, APT_Cerknica, 7_APT_Carinthia, CSE_8, APT_Zaplana, APT_Grapca, CSE_14, CSE_15, APT_Zala, APT_Dovje, CSE_7, APT_Bohinj, CSE_19, CSE_21, CSE_20, Vrkaluca_Cerna_Reka_SB, CSE_23, CSE_12, Riul_Tarova_Nera_drainage_RO, CSE_18, Baile_Herculane_RO, 11_APT_Alsace, Wien, Kovacs_patak_Marianosztra_HU, 10_APT_Rouderbaach, CSE_6, Bystricka_Bratislava_SK, CSE_16, CSE_17 → ustreza skupini **CSE**,
- Skupina 5: ZPB_48, ZPB_46, ZPB_47, ZPB_51, h49, ZPB_45, ZPB_44, ZPB_43, ZPB_42, ZPB_50 → ustreza skupini **ŽPB**.

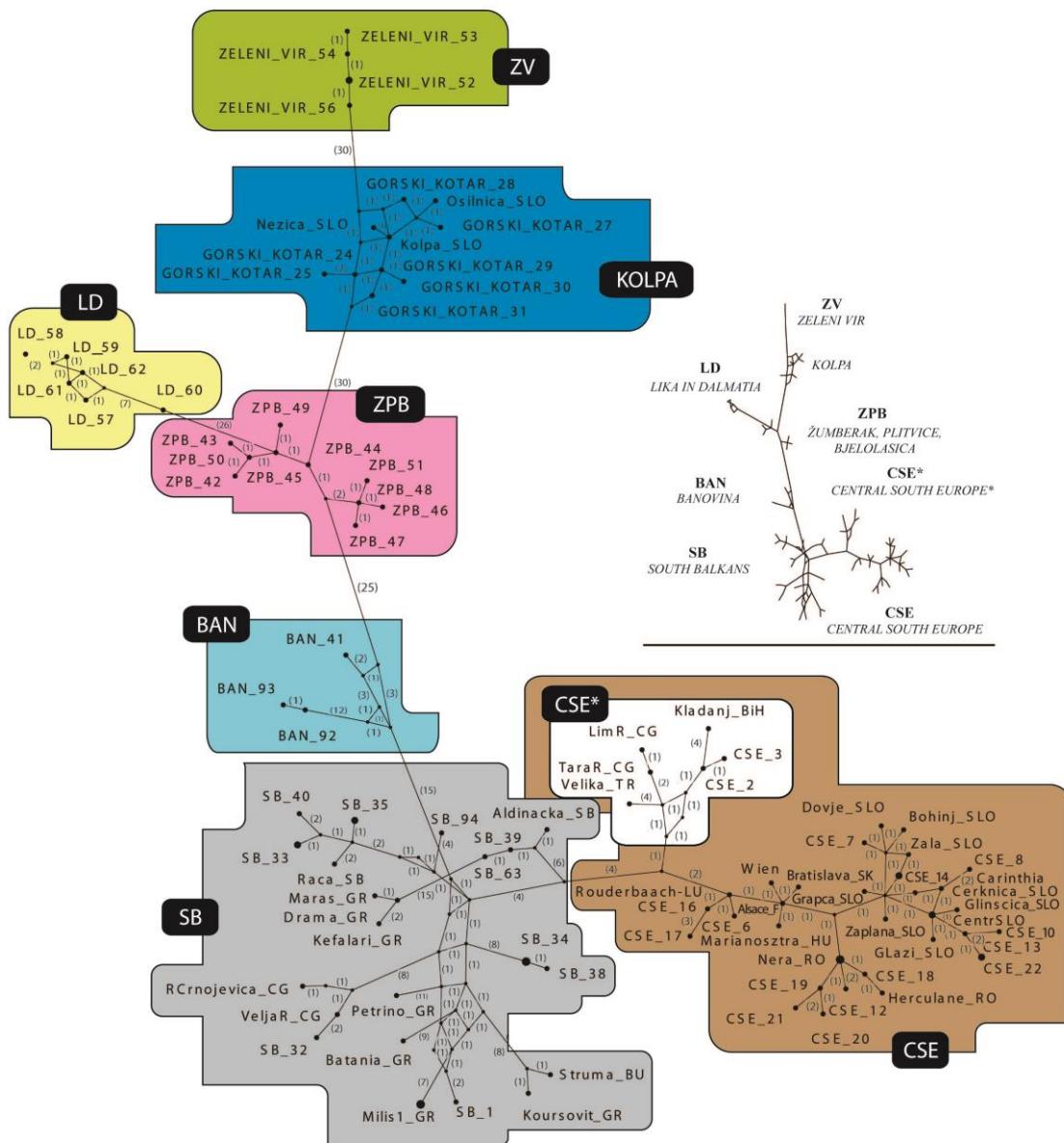
Tudi pri PTP analizi za ITS2 zaporedja smo dobili nejasne rezultate (16 skupin za 22 analiziranih sekvenc), edina sekvence, ki so združene v skupino so KLADANJ_BIH, Kolpa_SLO, GRIVACKIP_SLO, OSILNICA_SLO, Rakitna_SLO, kar ustreza skupini Kolpa.

4.1.3.3 Filogeografska obravnavava taksona *A. torrentium*

Haplotipi za analizo z metodo MJN so prikazani v prilogi D. Rezultati analize MJN razporejajo haplotipe v 8 filogeografskih skupin (Slika 19): ZV, Kolpa, LD, ZPB, BAN, SB, CSE in CSE* (nova skupina, v katero spadajo haplotipi Kladanj_BiH, LimR(CG, TaraR(CG CSE_2).

Mrežna analiza MJN je pokazala združevanje sorodnih haplotipov v filogeografske skupine. Vse filogeografske skupine so ločene s prejšnjim številom mutacij, med haplotipskimi skupinami iz severnega Balkana (Kolpa, ZV, LD, ŽPB, BAN) je bilo število

mutacij med 25 in 30, opazno manj mutacij je med skupinami CSE, CSE* in SB, kjer je tudi največ »zamreženih« odnosov (mediani vektorji). Znotraj skupin, torej med sosednjimi haplotipi, je število mutacij nizko (1 do 2 mutaciji), pri čemer odstopa populacijska struktura filogeografske skupine SB, kjer smo določili več linij, ki so od ostalih haplotipov ločene z več kot 8 mutacijskimi koraki. V vseh skupinah so odnosi zamreženi, v nobeni ni tipične zvezdaste topologije. Haplotska skupina ZV ima linearno topologijo. Haploti na koncih dolgih vej za filogeografske skupine ZV, Kolpa, LD, ŽPB in BAN kažejo, da gre za med seboj dolgo ločene populacije. Geografsko najbolj razširjeni haplotipi so iz filogeografskih skupin CSE in SB.

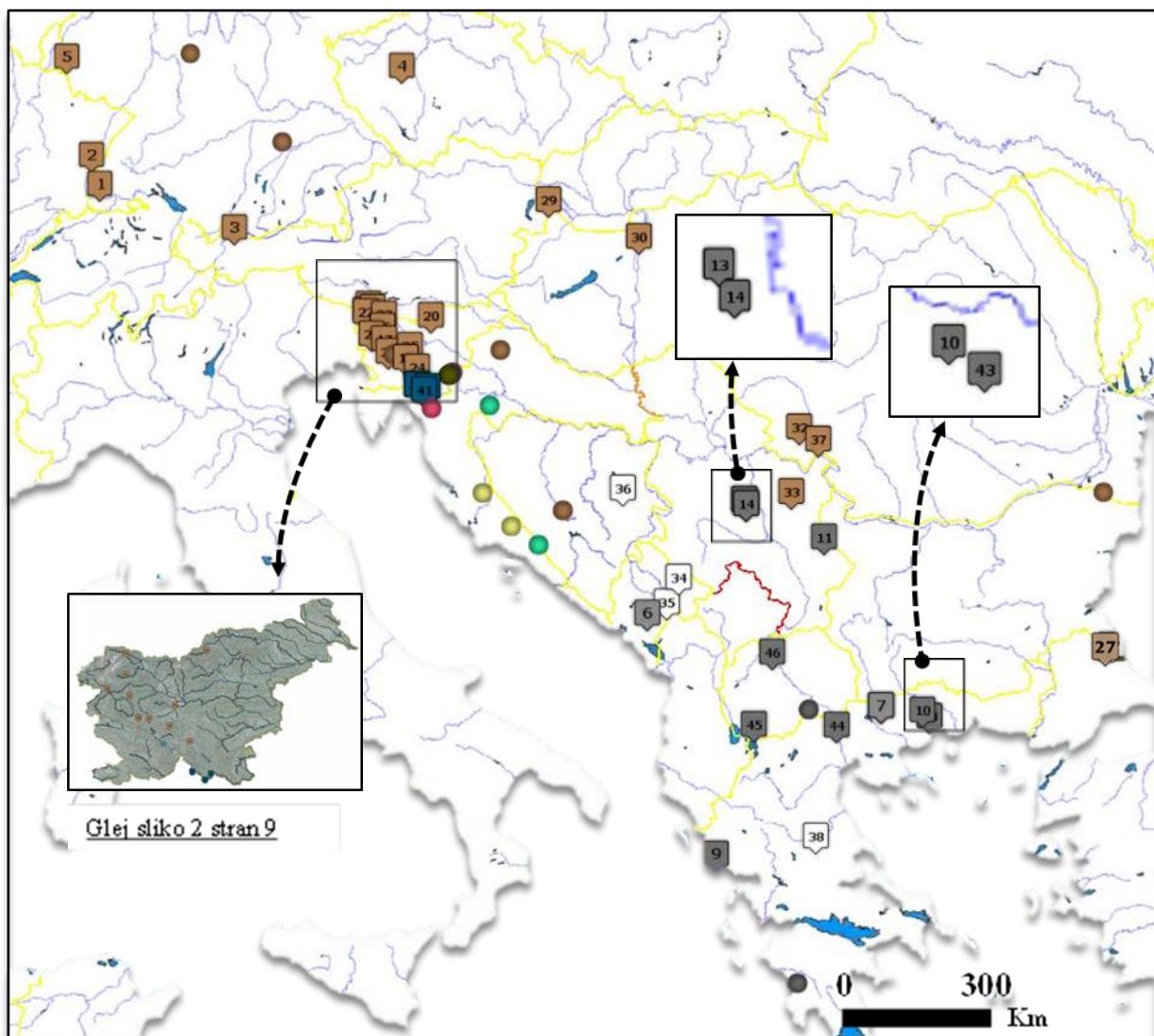


Slika 19: Analiza z metodo MJN za takson *A. torrentium* (lokus CO1). Prikaz 8 filogeografskih skupin: ZV (zeleno), Kolpa (temno modro), LD (rumeno), ZPB (roza), BAN (svetlo modro), SB (sivo), CSE (rjavo) in CSE* (belo). Številke v oklepaju prikazujejo število nukleotidnih substitucij.

Figure 19: Median-joining network (MJN) for *A. torrentium* CO1 haplotypes. 8 haplogrupes revealed: ZV (green), Kolpa (dark blue), LD (yellow), ZPB (pink), BAN (light blue), SB (grey), CSE (brown) in CSE* (white). Numbers in brackets represent amount of substitutions.

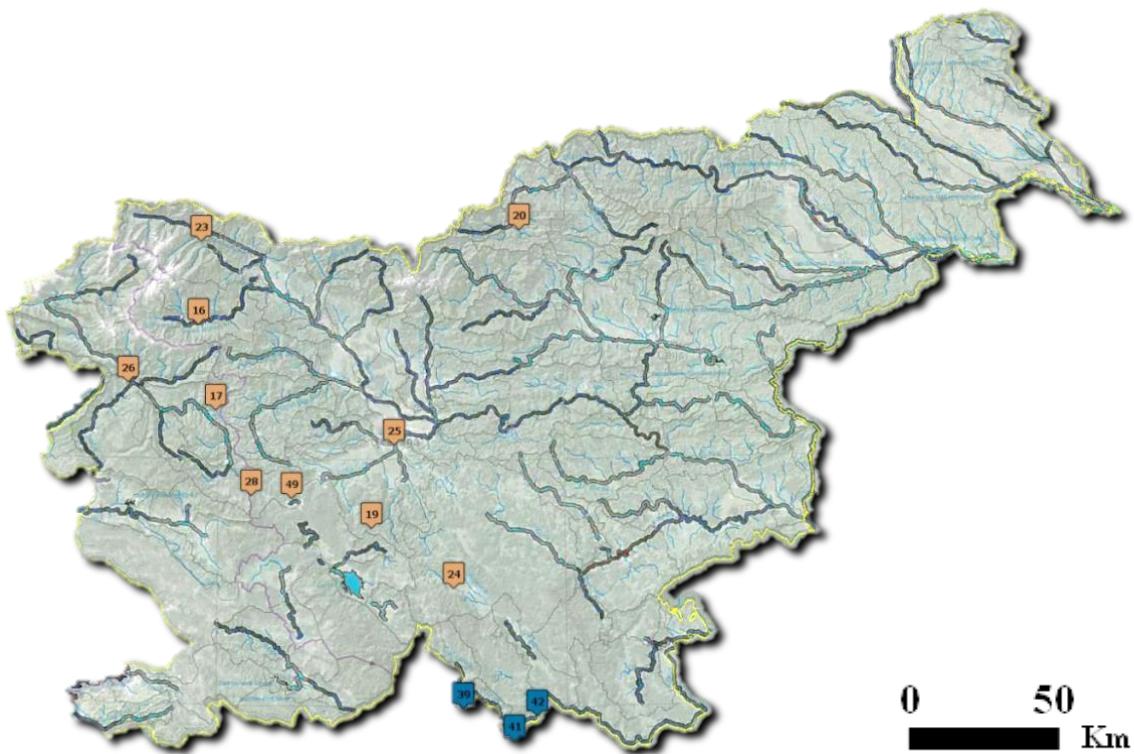
Na zemljevidu Evrope smo s programoma GoogleEarth in GoogleMaps prikazali lokacije analiziranih haplotipskih skupin (Slika 20, 21). Glede na filogenetske analize smo haplotipe razvrstili v 8 filogeografskih skupin: ZV, Kolpa, LD, ŽPB, BAN, SB, CSE in CSE* (nova skupina, v katero spadajo haplotipi Kladanj_BiH, LimR_CG, TaraR_CG

CSE_2). Haplotske skupine zavzemajo značilne areale, vseh šest haplotipskih skupin iz centralnega Balkana je striktno alopatričnih.



Slika 20: Zemljevid razporeditve filogeografskih skupin za takson *A. torrentium*. Označena so vzorčna mesta vseh vzorcev vključenih v filogenetske analize. Barvna legenda prikazuje filogeografske skupine: zeleno (ZV), temno modro (Kolpa), rumeno (LD), roza (ŽPB), svetlo modro (BAN), sivo (SB), rjava (CSE) in belo (CSE*).

Figure 20: Distribution map for taxon *A. torrentium* CO1. 8 haplogrups are represented: ZV (green), Kolpa (dark blue), LD (yellow), ZPB (pink), BAN (light blue), SB (grey), CSE (brown) in CSE* (white).



Slika 21: Zemljevid razporeditve filogeografskih skupin za takson *A. torrentium* v Sloveniji. Podrobnejši opis vzorcev je naveden v Preglednici 3. Barvna legenda prikazuje haplotipske skupine: rjava (haplotipska skupina CSE) in modra (haplotipska skupina Kolpa).

Figure 21: Map of the study area for taxon *A. torrentium* for Slovenian populations. For a detailed description see Table 3. Colour legend represents haplogroup: brown (haplogroup CSE) and blue (haplogroup Kolpa).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V okviru klasične taksonomije sta znotraj rodu *Austropotamobius* priznani dve vrsti: *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) ter *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803). Ustreznost takšne sistematske opredelitev in razvrstitev taksonov rodu *Austropotamobius* so zamajali rezultati številnih molekularnih filogenetskih raziskav v zadnjem desetletju in pol; po podatkih mnogih avtorjev je rod *Austropotamobius* genetsko precej bolj raznolik, kot je bilo to moč določiti na osnovi morfoloških podatkov (Grandjean in sod. 2000; Zaccara in sod., 2004; Fratini in sod., 2005; Trontelj in sod., 2005; Cataudella in sod., 2006; Ghia in sod., 2006; Stefani in sod., 2009; Klobučar in sod., 2013). Taksonomska nejasnost rodu *Austropotamobius* se je še dodatno zapletla, ker različni avtorji taksonomske enote razvrščajo na osnovi različnih metodoloških pristopov ter različnih vrstnih konceptov.

Pri izvedbi molekularnih filogenetskih analiz smo upoštevali dejstvo, da lahko imajo različni geni različno evolucijo (zaradi razlik v molekularni uri ter zaradi nepopolnega razvrščanja genealoških linij) in kot rezultat dajejo različna filogenetska oz. genska drevesa. Kot poudarjajo številni avtorji, je v izogib napakam značilnih za en gen ter natančnejšo rekonstrukcijo filogenije, smotrno v filogenetske raziskave vključiti podatke iz večih lokusov oz. večih genomov, genetski markerji naj bi bili nevezani, prav tako je smotrno uporabiti več metod (algoritmov) za ocenitev evolucijske zgodovine (Rannala in Yang, 2008). Kot najbolj obetavne so multilokusne koalescentne metode, katerih rezultat so vrstna drevesa (Edwards in sod., 2009), ki pa jih v naši raziskave zaradi premajhnega števila genetskih označevalcev žal nismo mogli izvesti. Da bi se približali vrstnemu drevesu, smo za rekonstrukcijo filogenetskih odnosov uporabili tri genetske označevalce iz obeh genomov: analizirali smo regijo, ki kodira mitohondrijski gen CO1, del mitohondrijskega gena 16S ribosomske DNA, ter jedrni odsek zaporedja ITS2. Poleg filogenetskih analiz za en genetski označevalc smo izvedli tudi analizo združenih lokusov. Prav tako smo za povečanje merodajnosti rezultatov izbrali nabor metod (BI, ML, MJN), saj je vsak filogenetski pristop podvržen določenim napakam. Rezultati naših filogenetskih

raziskav kažejo, da oba tradicionalna taksona rodu *Austropotamobius* predstavljata morfološko kriptični, a molekularno precej raznoliki evolucijski entiteti. Določili smo filetske skupine, ki jim lahko pripisemo hipotetičen vrstni ali podvrstni status. Poudarjam, da je naša kvantitativna in kvalitativna opredelitev taksonomskeih enot ter hierarhična razvrstitev taksonov rezultat izključno molekularnih filogenetskih analiz, razmejitev na vrste/podvrste pa smo obravnavali v kontekstu evolucijskega vrstnega koncepta (ESC). Hkrati se zavedamo, da je vsaka metodologija podvržena subjektivnemu vrednotenju in presoji.

Čeprav namen naše raziskave ni bil neposredno ocenjevanje geo-klimatskih dogodkov, ki so kakorkoli vplivali na današnjo razporeditev proučevanih taksonov, naj omenimo pomembnost geoloških procesov, predvsem alpidske orogeneze v srednjem in pozrem miocenu, ki so vplivali na preoblikovanje hidrografske mreže osrednje in južne Evrope, kar je imelo izjemen vpliv na evolucijsko zgodovino in genetsko raznolikost vodne favne v tem predelu Evrope (Verovnik in sod., 2005). Kot ocenjujejo Trontelj in sod. (2005), naj bi v tem obdobju kot posledica geografske izolacije (vikarianca zaradi orogeneze Alp) prišlo do alopatrične speciacije filetskih linij rodu *Austropotamobius*. Temu so sledile pleistocenske ledene dobe in kot je znano, je Balkanski polotok s svojo specifično paleogeološko zgodovino odigral pomembno vlogo glacialnega zatočišča (Gaston in David, 1994; Hewitt, 1999; Griffiths in sod., 2004) in, skupaj z Apeninskim polotkom, predstavlja zakladnico genetske raznolikosti tudi za potočne rake.

5.1.1 Takson *A. pallipes* sensu lato: delitev na dve hipotetični vrsti *A. pallipes* in *A. italicus*

Ugotovili smo, da ima takson *A. pallipes* sensu lato kompleksno genetsko strukturo in je konglomerat genetsko različnih mitohondrijskih (lokus CO1 in 16S rDNA) in jedrnih (ITS2) linij. Z izjemo BI analize za gen CO1 (Slika 7) smo z vsemi ostalimi izvedenimi filogenetskimi metodami in markerji dobili skladno osnovno topologijo filogenetskega drevesa za rekonstrukcijo filogenetskih odnosov (Slike 6, 8, 9). Topologije filogenetskih dreves tako za jedrno DNA (regija ITS2) (Slika 8) posebej in mitohondrijsko DNA (16S rDNA) (Slika 6) ter združenih lokusov (CO1+16S, CO1+ITS2 in/ali CO1+16S+ITS2)

(Slika 9) prikazujejo razvejitev tradicionalnega taksona *A. pallipes* sensu lato na dva monofiletska klada, ki zmeraj vsebujeta iste haplotipe. Podpore tej dihotomni cepitvi so visoke ($p_v = 1$, razen za filogram za gen CO1). Znotraj omenjenih dveh kladov je precej nerazrešenih odnosov (politomija). Tudi izris in ocenitev drevesa za gen CO1 z metodo ML podpira dihotomno razvejitev znotraj taksona *A. pallipes* sensu lato (Priloga E), odstopa pa filogenetsko drevo z metodo BI na osnovi zaporedja CO1 (Slika 7), ki dihotomne razvejitve ne podpira, ampak filogenetske odnose prikazuje kot politomijo štirih filetskih skupin, pri čemer izstopa dolga veja, ki vodi do haplotipske skupine W Europe (to skupino smo z drugimi filogenetskimi analizami definirali kot hipotetično vrsto *A. pallipes* sensu stricto) in poudarja veliko genetsko razdaljo te skupine napram ostalim. Do podobnega zaključka za CO1 marker so prišli tudi Trontelj in sod. (2005), ki v svoji raziskavi delitve taksona *A. pallipes* sensu lato na dve vrsti ne podpirajo. Ob tem naj opomnimo na pristranskost uporabe enega gena za rekonstrukcijo poteka evolucijske zgodovine, saj kot opozarjajo številni raziskovalci, filogenetska drevesa, ki jih ocenimo na osnovi enega gena (genetska drevesa), zaradi nepopolnega sortiranja linij prikazujejo genealoške poti, ki pa pogosto ne podajajo prave evolucijske zgodovine (Rannala in Yang, 2008).

Hipotezo o dveh ločenih kladih (*A. pallipes* in *A. italicus*) so na osnovi mtDNA podprli mnogi avtorji (Grandjean in sod., 2000a, b; Iaconelli, 2001; Zaccara in sod., 2004; Barič in sod., 2005; Fratini in sod., 2005; Cataudella in sod., 2006; Ghia in sod., 2006; Dieguez-Urbieondo in sod., 2005; Stefani in sod., 2009; Pedraza-Lara in sod., 2010; Matallanas in sod., 2011, 2012) in podpiramo jo tudi s svojimi rezultati na osnovi mtDNA. S čimer pa dodatno dopolnjujemo obstoječe znanje, je potrditev dveh monofiletskih evolucijskih entitet na osnovi jedrnega zaporedja ITS2 ($p_v = 1$) (Slika 8, 9). Jedrno zaporedje ITS2, ki je v naši raziskavi bilo prvič uporabljeno za filogenetske analize rodu *Austropotamobius*, je neodvisno od mitohondrijskega genoma, zato lahko sklepamo, da med kladoma ni genskega pretoka in ju v kontekstu ESC opredeljujemo kot dve vrsti.

Poudariti je treba tudi, da smo v raziskavi zaobjeli celotno območje, ki ga tradicionalni takson *A. pallipes* sensu lato naseljuje. Nerazrešeni odnosi in razlike med genetskimi drevesi so namreč lahko posledica nepopolnega vzorčenja in kot poudarjajo nekateri

avtorji, je za dobro rekonstrukcijo evolucijske zgodovine dodajanje vzorcev vsaj tako (če ne bolj) pomembno kot dodajanje lokusov (Maddison in sod., 2006; Lambert in sod., 2015). Namreč, večina predhodnih raziskav je bilo opravljenih na populacijah iz predvsem centralnih in zahodnih poselitvenih arealov za takson *A. pallipes* sensu lato (Italija, Francija, Španija, Nemčija, Avstrija, Slovenija), medtem kot so populacije iz jugovzodnega areala (zahodni del Balkanskega polotoka) pogosto bile slabo zastopane (ali sploh ne). S filogenetskimi in filogeografskimi analizami smo ugotovili, da imata obe hipotetični vrsti dokaj specifično geografsko razporeditev (Slika 12):

- Klad *A. pallipes* sensu stricto najdemo v vodotokih zahodne Evrope (centralna in severozahodna Italija, Francija, Nemčija, Britansko otoče, Švica),
- Klad *A. italicus* (haplotipske skupine SE Alps+W Balkans in Apennine, Istra 1, NW Italy) je prisoten na Apeninskem, Pirenejskem in Balkanskem polotoku ter porečjih osrednje Evrope.

Velika genetska razdalja (razvidna tako v filogenetskih drevesih, v analizi mrežnih odnosov ter ocenjena s p-razdaljo) med kladoma prav tako govori o razlikah, ki so značilne za medvrstno raven. Evolucijski razhod med omenjenima ločenima kladoma je velik (na osnovi zaporedja CO1 določena p-razdalja = 0.084 ± 0.014), kot primer navajamo velikost p-razdalje med vrstami znotraj potočnih rakov rodu *Astacus* (p-razdalja = 0.09 ± 0.01) (Trontelj in sod., 2005).

Filetske skupine, ki smo jih opredelili tako s filogenetskimi metodami, filogeografsko analizo MJN ter metodami za razmejitev vrst na osnovi DNA (ABGD in PTP) delno sovpadajo s haplotipskimi skupinami, ki so jih v filogenetski raziskavi na osnovi CO1 opredelili že Trontelj in sod. (2005): haplotipska skupina W Europe, haplotipska skupina NW Italy, haplotipska skupina Istra1, haplotipska skupina SE Alps + W Balkans in haplotipska skupina Apennine; slednji smo obravnavali združeno (SE Alps + W Balkans in Apennine), saj osnovna politomija za haplotipe teh dveh skupin nakazujejo na številne nerazrešene odnose. Pravtako so haplotipi teh dveh skupin združeni z metodama ABGD (Slika 10) in PTP, z metodo mrežnih odnosov (Slika 11) pa sta ti dve skupini sicer predstavljeni ločeno, vendar je med njima število mutacijskih korakov nizko (1-2), prav tako so odnosi precej zamreženi. To dopoljuje rezultate raziskave na osnovi 16S rDNA

(Fratini in sod., 2005), ki so haplotipe iz teh dveh skupin opredelili kot en takson, namreč kot podvrsto *A. i. meridionalis*.

V raziskavi nismo podprli haplotipske skupine Istra 2, ki so jo v raziskavi na osnovi mtDNA (gen CO1) opredelili Trontelj in sod. (2005); ti haplotipi se nahajajo znotraj haplotipskih skupin SEALps +WBalkans in Apennine (takson *A. i. meridionalis*, Fratini in sod., 2005). Prav tako nismo potrdili dveh podvrst znotraj klada *A. pallipes* sensu stricto, kot so to predlagali Souty-Grosset in sod. (2006): *A. p. pallipes* za področje Francije, britanskega otočja in Nemčije ter *A. p. subsp. nov.* za področje Ligurije (Italija) in Alpes Maritimes (Francija). V naši raziskavi se je klad *A. pallipes* sensu stricto izkazal za genetsko precej homogenega.

Za Pirenejski polotok smo potrdili, da vsi haplotipi (za to območje smo jih določili šest) pripadajo italijanskim, in sicer filogeografski skupini NW Italy. Strinjamо se, kot poročajo v številnih prejšnjih raziskavah (Zaccara in sod., 2004; Fratini in sod., 2005; Trontelj in sod., 2005; Chiesa in sod., 2011), da je takson *A. italicus* v španske vode po vsej verjetnosti naselil človek.

Z filogenetskimi in filogeografskimi analizami smo opredelili tudi taksonomski položaj slovenskih populacij: te pripadajo vrsti *A. italicus*, natančneje dvem filogeografskim skupinam tega klada: Istral1 in SEALps+W Balkans (Slika 13).

5.1.2 Takson *A. torrentium*

Vsa ocnjena filogenetska drevesa (lokusi 16S, CO1, ITS2 posebej in združeni) (Slike 14, 15, 16, 17) imajo precej različne topologije, vendar lahko v vseh jasno opredelimo 8 filetskih skupin, od katerih jih sedem sovpada s skupinami, ki so jih v raziskavi, izvedeni na mtDNA, opredelili Klobučar in sod. (2013), tako da smo uporabili nekatera imena teh haplotipskih skupin: ZV, Kolpa, LD, ŽPB, BAN, SB, CSE, na novo smo opredelili skupino CSE* (skupina, v katero spadajo haplotipi Kladanj_BiH, LimR_CG, TaraR_CG, CSE_2). Vse haplotipske skupine iz severno-centralnih Dinaridov (ZV, Kolpa, LD, BAN, ŽPB) tvorijo monofiletske klade z relativno dobro podporo ($p > 0.75$), vendar so filogenetski

odnosi med njimi nerazrešeni zaradi neenotne bazalne topologije (neenotno razvezjani kladi) med vsemi ocjenjenimi filogenetskimi drevesi. Za klade SB, CSE in CSE* nismo podprli monofiletskega izvora z vsemi analiziranimi zaporedji DNA. Klada SB in CSE imata izrazito bazalno politomijo (Slike 14, 15, 16, 17).

Najbolje podprto filogenetsko drevo je ocenjeno na osnovi združenih lokusov (Slika 17): topologija tega drevesa se bistveno razlikuje od topologije dreves izpeljanih iz analiz mtDNA in vključuje 8 monofiletskih kladov z dobro podprtimi razvejitvami ($p_v > 0.86$), razen ene slabše podprte razvejite znotraj skupin iz severo-zahodnega dela Dinarskega gorstva ($p_v = 0.65$ za razvejitev med kladi Kolpa, ZV in ŽPB). V tem filogenetskem drevesu lahko razločimo dve evolucijski liniji: eno zastopajo haplotipi kladov CSE in SB ter haplotip Velika_TR, v drugi evolucijski liniji pa si hierarhično sledijo skupine CSE*, BAN, LD, ŽPB, ZV ter Kolpa. Globoka filogenetska razvejitev kladov in velike genetske razdalje med kladi iz severo-zahodnih Dinaridov pričajo o daljšem časovnem obdobju izolacije teh populacij. Čeprav v naši nalogi nismo izvedli analiz z molekularno uro, ti rezultati kažejo, da je do poseljevanja območja današnjih Dinaridov s taksonom *A. torrentium* in ločitve teh populacij prišlo zelo zgodaj. O tem poročajo v raziskavi na osnovi zaporedij mtDNA (Klobučar in sod., 2013), kjer so ocenili čas razhajanja kladov iz območja Dinaridov (pred 5.6 do 3 milijoni let). Ti dogodki sovpadajo s procesom karstifikacije Dinaridov v pliocenu (Trontelj in sod., 2007). Prav tako smo med temi kladi ocenili relativno velik evolucijski razhod: za skupine Kolpa, ZV, LD, ŽPB je med vsako izmed teh skupin, tudi v odnosu do skupin CSE in SB, p-razdalja med 0.07 in 0.09, haplotipi iz skupine BAN v primerjavi s skupinama SB in CSE pa imajo p-razdaljo med 0.058 in 0.063. V primerjavi z velikostjo p-razdalje med hipotetičnima vrstama *A. pallipes* sensu stricto in *A. italicus* (p-razdalja = 0.084 ± 0.014) ter med vrstami znotraj rodu *Astacus* (p-razdalja = 0.09 ± 0.01) (Trontelj in sod., 2005), jih lahko opredelimo kot hipotetične kriptične vrste, kar so predlagali tudi v raziskavi na osnovi mtDNA Klobučar in sod. (2013). Poudarimo naj, da so kladi iz severnega dela Balkanskega polotoka striktno alopatrični, vse filogenetske analize pa so pokazale, da med njimi ni genetskega pretoka.

Jedrnih zaporedij ITS2 smo imeli sicer precej manj kot za preostala dva genetska označevalca, vendar so tudi ti rezultati jasno potrdili evolucijsko razhajanje med haplotipi

filogeografskih skupin CSE in SB ter filogeografskih skupin haplotipov iz severozahodnega dela Balkanskega polotoka. Filogenetsko drevo na osnovi jedrnega lokusa ITS2 (Slika 16) ima izrazito bazalno politomijo, razločimo lahko velik evolucijski razhod med haplotipi iz Kolpe (Slo), Osilnice (Slo), Grivački Potok (Slo) in Kladnja (Kladanj_BiH ter Lim_CG), ter ostalimi haplotipi iz skupin CSE in SB. Iz tega lahko sklepamo, da med populacijami iz severno-centralnih Dinaridov (kladi Kolpa, ZV, ŽPB, BAN in LD) in populacijami iz severnega (linija CSE) in južnega (linija SB) poselitvenega območja taksona *A. torrentium* ni genskega pretoka. To nakazuje na zgodnjo ločitev omenjenih populacij ter morebitno kriptično speciacijo balkanskih filetskih skupin (Slika 20). Za podrobnejšo analizo sorodstvenih odnosov predlagamo nadaljne analize jedrnega genoma.

Klad CSE*, ki ga zastopajo haplotipi iz geografsko majhnega območja porečij Bosne in Hercegovine ter Črne Gore, zavzema precej nejasen filogenetski položaj: v filogenetskih drevesih na osnovi analiz mtDNA (Slika 14, 15) je ta skupina prikazana kot parafiletska s haplotipi skupine CSE, ko pa mtDNA dodamo še jedrno informacijo (zaporedja ITS2), je ta monofiletska skupina bliže skupinam iz Dinaridov (ZV, Kolpa, LD, BAN, ŽPB): kaže namreč dihotomijo z vejo za skupine iz severno centralnih Dinaridov z relativno visoko podporo ($p_v = 0.86$) (Slika 17). Na tem primeru je dobro razvidno, kako se lahko evolucijska informacija med različnimi genomi razlikuje in kako zahtevna in kompleksna je rekonstrukcija evolucijske zgodovine. Za razjasnitev položaja te skupine predlagamo dodatne analize zaporedij iz obeh genomov.

Z filogeografsko metodo MJN smo potrdili 8 filogeografskih skupin, ki so jasno ločene z velikim številom mutacij. V tej analizi je skupina CSE* (haplotipi Kladanj_BiH, LimR_CG, TaraR_CG, CSE_2 in dodatno Velika_TR) prikazana med skupina CSE in SB (Slika 19).

Haplotip Velika_TR zavzema v vseh analizah poseben položaj: v analizi regije 16S rDNA (Slika 15) kaže dihotomijo s skupino CSE*, v analizi gena CO1 (Slika 14) je v parafiletskem odnosu s haplotipskima skupinama CSE* in CSE, v analizi združenih lokusov (Slika 17) pa je politomna s skupinama CSE in SB, v filogenetski analizi jedrnega zaporedja ITS2 (Slika 16) se haplotip Velika_TR nahaja v skupini skupaj s haplotipi CSE in SB. Lahko bi rekli, da ta haplotip »povezuje« skupini SB in CSE. Podoben položaj so

haplotipu Velika_TR pripisali Trontelj in sod. (2005): sicer omenjen haplotip uvrščajo v skupino SB, vendar je v njihovi analizi z metodo MJN ta skupina umeščena med skupinama SB ter centralno evropsko skupino (Southeastern Alps+Slovenia).

Rezultati metod za razmejitve vrst na osnovi DNA (ABGD in PTP) so bili precej zahtevni za interpretacijo. Z analizo odseka gena CO1 z metodo ABGD (Slika 18) smo določili šest skupin, ki so v skladu z ostalimi filogenetskimi analizami; pet od teh je iz območja osrednjih Dinaridov (Kolpa, ZV, LD, ŽPB, BAN) ena skupina pa zajema haplotipe iz skupin SB, CSE in CSE*.

S filogenetskimi in filogeografskimi analizami smo opredelili tudi taksonomski položaj slovenskih populacij: te pripadajo haplotipskim skupinam CSE in Kolpa; slednje so prisotne samo v zgornjem porečju reke Kolpe na slovensko-hrvaški meji (Slika 21).

5.1.3 Naravovarstveni aspekt

Za varstvo potočnih rakov je v pravnem sistemu varstva narave dobro poskrbljeno, saj sta v Sloveniji koščenec *A. pallipes* in koščak *A. torrentium* kot ranljivi vrsti uvrščena v Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam (Ur.l. 82/2002), zavarovana pa na podlagi Zakona o ohranjanju narave ter z Uredbo o zavarovanih prostozivečih živalskih vrstah (Ur.l. RS 46/2004, 109/2004, 84/2005, 115/2007) in uvrščena v njeni prilogi 1A in 2A (varstvo domorodne vrste in varstvo habitata). Za obe vrsti so tudi razglašena posebna varstvena območja Natura2000 (Govedič, 2006). Lov vseh avtohtonih potočnih rakov pri nas je danes prepovedan, za odvzem, naseljevanje, preseljevanje ali doseljevanje pa je potrebno dovoljenje Ministrstva za okolje in prostor. Kar predstavlja problem in grožnjo (v naravovarstvenem in naravoljubem smislu) je neozaveščen in nespoštljiv odnos človeka do narave: človek s svojimi nepremišljenimi posegi v naravo slabša ali uničuje naravne življenske prostore, s komunalnimi in industrijskimi odplakami ter intenzivnim kmetijstvom onesnažuje vodne ekosisteme, zaradi nevednosti in neznanja izpušča tujerodne vrste. Slovenske vode sicer ni doletelo načrtno naseljevanje tujerodnih vrst potočnih rakov (kot v marsikateri evropski državi), kljub temu so leta 2003 v reki Muri

na avstrijsko-slovenski meji prvič odkrili signalnega raka (*Pacifastacus leninculus*) (Govedič, 2006), pri čemer gre za širjenje iz naturalizirane populacije v Avstriji, od leta 2007 pa je prisoten tudi v reki Dravi (Hudina in sod., 2009). Poleg tega so leta 2009 v termalni mrtvici Topla pri Čatežu registrirali rdečeškarjevca (*Cherax quadricarinatus*), ki izvira iz Avstralije (Jaklič in Vrezec, 2011), ki pa je trenutno omejen le na mesto vnosa (uspešno se razmnožuje le v toplih vodah od 25 do 30°C). Naj poudarimo, da so v številnih vodah širom Evrope kamor so naselili ameriške vrste potočnih rakov, domorodne vrste povsem izumrle zaradi račje kuge, ki jo le-te prenašajo. Pri vzorčenju osebkov za našo raziskavo smo poleg avtohtonih potočnih rakov identificirali še naslednje tujerodne vrste potočnih rakov:

- *Pacifastacus leninculus* (reka Isere v Franciji),
- *Orconectes immunis* (reka Ren, francija),
- *Cherax destructor* (Španija),
- *Procambarus clarkii* (reka Durance, porečje reke Rone, Francija).

Dodamo naj, da lahko obveščena in ozaveščena javnost pomembno prispeva k ohranjanju biotske pestrosti. Žal je v Sloveniji izobraževanje javnosti o rakah oz. o vodnih ekosistemih na splošno bolj ali manj samoiniciativno. Kot primer dobre prakse naj omenimo poljudnoznanstveno publikacijo Centra za kartografijo favne in flore iz leta 2006 o razširjenosti, ekologiji in varstvu potočnih rakov Slovenije.

Z naravovarstvenega vidika, nejasnosti v taksonomiji otežujejo načrtovanje varstvenih strategij in upravljanje ogroženih vrst. Pomemben korak v varstveni biologiji, ki je veliko doprinesel k izboljšanju načrtovanja in izvajanja varstvenih ukrepov zavarovanih in potencialno ogroženih vrst, je proučevanje genetske raznolikosti populacij ter filogeografije (Frankel in Soulé, 1981). Filogeografske raziskave omogočajo identifikacijo »Evolucijsko pomembnih enot« (ESUs) in s tem pripomorejo k lažji opredelitvi varstvenih prioritet (Moritz, 1994). Na osnovi rezultatov naše raziskave smo znotraj kompleksa vrst *A. pallipes* sensu lato potrdili obstoj dveh evolucijskih entitet, ki ju v skladu z evolucijskim vrstnim konceptom opredeljujemo kot dve vrsti, *A. pallipes* sensu stricto in *A. italicus*, iz naravovarstvenega vidika pa ju je potrebno obravnavati kot ločeni evolucijsko pomembni enoti (ESU), kar pa pomeni ločena varstvena območja za posamezne ESU ter nedovoljen prenos osebkov med različnimi ESU-ji. Ker slovenske populacije koščenca pripadajo vrsti

A. italicus, zakonsko pa je pri nas zaščitena vrsta *A. pallipes*, bodo za uspešno naravovarstveno upravljanje potrebne spremembe, kar je pomembno predvsem v primeru prenosa/naseljevanja populacij *A. pallipes* sensu lato iz drugih delov Evrope v slovenske vode.

V primeru koščaka (takson *A. torrentium*) smo ugotovili, da filogeografske skupine iz območja severno-centralnega Dinarskega gorstva (filetske linije ZV, Kolpa, LD, BAN, ŽPB) predstavljajo ločene evolucijske entitete in jih iz naravovarstvenega vidika lahko opredelimo kot ločene ESU-je, z ločenimi varstvenimi območji ter nedovoljenim prenosom osebkov med različnimi ESU-ji.

Prepričani smo, da z varovanjem potočnih rakov, kot komponento biološke raznolikosti, prispevamo tudi k splošnemu varovanju vodnih ekosistemov. Nenazadnje, z zaščito vrst posredno zaščitimo tudi njihov habitat, ohranjanje biotske raznolikosti pa naj bo ena izmed glavnih nalog človeštva.

5.2 SKLEPI

Takson *A. pallipes* sensu lato

- Filogenetske analize zaporedij 16S rDNA, COI in ITS2 so pokazale, da takson *A. pallipes* sensu lato zastopata dva monofiletska klada, ki ju zaradi velike genetske razdalje in značilne geografske razporeditve lahko opredelimo kot dve samostojni vrsti *A. pallipes* sensu stricto in *A. italicus*. Da med omenjenima kladoma ni genetskega pretoka, smo potrdili z filogenetsko analizo mitohondrijskega (zaporedja gena CO1 in 16S rDNA) in jedrnega genoma (sekvence ITS2).
- Kladu *A. pallipes* sensu stricto pripadajo populacije zahodne in osrednje Evrope, medtem ko kladu *A. italicus* pripadajo populacije osrednje Evrope, Apeninskega, Pirenejskega in Balkanskega polotoka. Areala obeh kladov sta v glavnem alopatrična, oba klada soobstajata (simpatrija) na področju severozahodne Italije.
- V slovenskih vodotokih so prisotne haplotipske populacije Istra1, SE Alps + W Balkans, ki pripadajo vrsti *A. italicus*.

Takson *A. torrentium*

- Takson *A. torrentium* je na osnovi filogenetskih analiz združba 8 filogeografskih skupin: ZV, Kolpa, LD, BAN, ŽPB, SB, CSE in CSE*.
- Haplotski skupini CSE in SB sta razširjeni v porečjih centralne in jugovzhodne Evrope ter južnega Balkana.
- Pet filogeografskih linij iz območja severnega in centralnega Dinarskega gorstva (ZV, Kolpa, ŽPB, LD, BAN), ki so striktno alopatrične, je ločenih z veliko genetsko razdaljo in jih lahko opredelimo kot potencialne vrste.
- Skupina CSE* je bila v tej raziskavi na novo opredeljena; haplotipi, ki pripadajo tej skupini, so iz geografsko omejenega območja porečij držav Bosne in Hercegovine ter Črne Gore; v primeru filogenetskih analiz združenih sekvenc (CO1, 16S in ITS2) tvori skupino, ki ima dihotomno ceplitev z vejo za skupine iz centralnega Balkana (ZV, Kolpa, ŽPB, LD, BAN).
- V slovenskih vodotokih so za takson *A. torrentium* prisotni filogeografski skupini CSE in Kolpa (samo v zgornjem porečju reke Kolpe na slovensko-hrvaški meji).

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

V zadnjih dveh desetletjih je bilo opravljenih preko 20 filogenetskih raziskav v zvezi s taksonomijo in sistematiko potočnih rakov rodu *Austropotamobius*, kljub temu neenotnost v zvezi s taksonomsко opredelitvijo števila vrst in podvrst tega rodu ostaja. V naši raziskavi smo z različnimi filogenetskimi pristopi in na različnih genetskih označevalcih določili taksonomske enote (hipotetične vrste/podvrste) ter rekonstruirali sorodstvene odnose znotraj rodu *Austropotamobius*.

Naš prispevek je bil zaobjeti celotno geografsko območje, ki ga rod *Austropotamobius* naseljuje in na osnovi treh DNA zaporedij rekonstruirati njegovo filogenijo. Raziskava je potekala v dveh sklopih: (1) Analiza filogenije in filogeografije taksona *A. pallipes* sensu lato, ki je v novejši znanstveni literaturi pogosto označen kot kompleks vrst ter preveriti hipotezo o obstoju večih hipotetičnih kriptičnih vrst. (2) Analiza filogenije in filogeografije taksona *A. torrentium*, ki je sicer manj raziskan kot njegov sestrski takson in ima po najnovejših raziskavah prav tako podobno globoko molekularno strukturo ter preveriti prisotnost med- in/ali znotrajvrstnih filetskih linij. Za filogenetske raziskave smo uporabili tri genetske markerje: dva mitohondrijska (CO1 in 16S rDNA) in enega jedrnega (ITS2). Vsem trem genetskim označevalcem smo določili evolucijski model ter jih obravnavali ločeno in združeno. Hipotetične vrste (PSHs) smo določili tudi z metodami za DNA razmejitev vrst (distančno metodo ABGD in na drevesu basirajočo metodo PTP). Filogenetske analize za razjasnitev znotrajvrstnih in potencialnih medvrstnih odnosov smo ocenili z metodami ML in BI. Izvedli smo tudi mrežno analizo MJN, gensko raznolikost pa smo ocenili s p-razdaljo.

S filogenetskimi analizami smo za takson *A. pallipes* sensu lato potrdili hipotezo o obstoju dveh kladov v rangu vrste: *A. pallipes* in *A. italicus*. Z naravovarstvenega vidika omenjena klapa opredeljujemo kot ločeni evolucijsko pomembni enoti (ESU), kar pomeni ločena varstvena območja ter nedovoljen prenos osebkov med območji. Slovenske populacije

koščenca (primorski koščak) *A. pallipes* sensu lato pripadajo filetski liniji *A. italicus*, natančneje dvem haplotipskim skupinam tega klada: Istra1 in SEAlps+W Balkans.

Za takson *A. torrentium*, smo ugotovili, da je konglomerat 8 filetskih linij, ki so genetsko precej raznolike. Izstopa predvsem pet striktno alopatričnih filogeografskih skupin iz severno-centralnih Dinaridov (Kolpa, ZV, LD, ŽPB in BAN), ki se med seboj, in tudi od ostalih treh skupin (SB, CSE in CSE*), razlikujejo z veliko genetsko razdaljo. Te skupine so v vseh filogenetskih in filogenografskih analizah monofiletske, zaradi pomanjkanja enotne bazalne topologije za analize različnih lokusov pa žal nismo mogli razjasniti filogenetskih odnosov. Te skupine lahko opredelimo kot hipotetične kriptične vrste, iz naravovarstvenega vidika pa jih lahko označimo kot ločene ESU-je, kar ima za posledico ločena varstvena območja za posamezne ESU-je ter nedovoljen prenos osebkov med območji. Slovenske populacije koščaka *A. torrentium* pripadajo dvem haplotipskim skupinam tega klada: Kolpa in CSE.

Z rezultati, ki smo jih dobili z molekularnimi filogenetskimi analizami treh zaporedij DNA (ITS2, CO1, in 16S rRNA), smo dopolnili obstoječe znanje o filogeniji in filogeografiji vrst rodu *Austropotamobius* ter ga pregledno uredili. Rezultati predstavljali pomemben prispevek k taksonomiji in varstveni biologiji rodu *Austropotamobius* v Sloveniji in tudi širše.

6.2 SUMMARY

In past two decades more than 20 studies have been done to investigate systematic uncertainties in the crayfish genus *Austropotamobius*. The purpose of this study was to clarify the taxonomy of European crayfish genus *Austropotamobius*. In this study, we used three genetic markers, two from the mitochondrial genome (part of ribosomal gene 16S rRNA and a portion of the cytochrome oxidase subunit 1 CO1) and one nuclear (ITS2, Internal transcript spacer). Both mitochondrial genes have been the subject of several previous phylogenetic and phylogeographic studies, but taxonomic and systematic uncertainties of that genus remain.

Our aim was to encompass the entire geographical area that genus *Austropotamobius* inhabits and to reconstruct the phylogeny on the basis of the three DNA sequences. The study was conducted in two stages: (1) Analysis of phylogenetic and phylogeography taxon *A. pallipes sensu lato*, which is often characterized as a “species-complex” and verification of the existence of several hypothetical cryptic species. (2) Analysis of phylogenetic and phylogeography for taxon *A. torrentium* and verification for the presence of intraspecific phyletic lineages. For all three genetic markers evolutionary model were determined, markers were analyzed separately and combined (concatenated). To resolve taxonomic uncertainties we used several methods: (1) Maximum likelihood method (ML; Maximum likelihood). (2) Bayesian approach (BI, Bayesian interference). (3) The methods for determining the reticulate relationships (MJN). (4) We also tested the usefulness of modern statistical algorithms for molecular delimitation of species (ABGD and PTP) and a primary species hypothesis (PSHs, Primary species hypothesis).

Based on the results of phylogenetic studies for taxon *A. pallipes sensu lato* we confirmed the hypothesis of the existence of two clades confirming separate species: *A. pallipes* and *A. italicus*. From the view of biological conservation both taxons are defined as separate evolutionary significant units (ESUs), which leads to separate protected areas and prohibited translocation of specimens between areas. Slovenian populations belong to taxon *A. italicus*, more specifically to two haplogroups: Istra1 and SEAlps + W Balkans.

We found out that taxon *A. torrentium* is a conglomerate of 8 phyletic lineages that are genetically quite diverse. Five of them, geographically placed within the northern-central Dinaric region, are strictly allopatric and each of them comprises genetically distinct phylogroup. In terms of biological conservation, this five isolated phylogroups of stone crayfish should be considered as ESUs and therefore should be given the highest conservation priority (each unit has a separate protected area, prohibited translocation of specimens between areas). Slovenian population of *A. torrentium* belonging to two haplogroups: Kupa (sl. Kolpa) and CSE.

The results of molecular phylogenetic analyzes represent an important contribution to taxonomy and conservation biology of the genus *Austropotamobius* in Slovenia and beyond.

7 VIRI

- Albrecht H. 1982. On the origin of the Mediterranean crayfish. *Quaderni del Laboratorio di Tecnologia della Pesca*, 3: 335-362
- Avise J.C., Ball R.M. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. V: *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, Vol. 7. Futuyama D.J., Antonovics J. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 45-67
- Avise J.C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Cambridge (Massachusetts), Harvard University Press: 447 str.
- Banarescu P. M. 2004. Distribution pattern of the aquatic fauna of the Balkan Peninsula. V: *Balkan Biodiversity: Pattern and Process in the European Hotspot*. Griffiths H.I., Krystufek B., Reed J.M. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 203-219
- Bandelt H. J., Forster P., Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48
- Baric S., Höllrigl A., Kerschbamer C., Füreder L., Petutschnig J., Dalla Via J. 2005. Update of the molecular phylogeny of the species complex by including specimens from South Tyrol (Italy) and Carinthia (Austria). *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture*, 376-377: 627-636
- Bedjanič M. 2004. Novi podatki o razširjenosti raka navadnega koščaka *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) v Sloveniji (Crustacea: Decapoda). *Natura Sloveniae*, 6: 25-33
- Bohl E. 1987. Comparative studies on crayfish brooks in Bavaria (*Astacus astacus* L., *Austropotamobius torrentium* Schr.). *Freshwater Crayfish*, 7: 287-294
- Bott R. 1950. Die Flusskrebse Europas (Decapoda, Astacidae). *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft*, 483: 1-36

- Brodkij S. Ya. 1983. On the systematics of Palaearctic Crayfish (Crustacea, Astacidae).
Freshwater Crayfish, 5: 464-470
- Cataudella R., Paolucci M., Delaunay C., Ropiquet A., Hassanin A., Balsamo M. 2010. Genetic variability of *Austropotamobius italicus* in the Marches region: implication for conservation. Aquatic Conservation, 20: 261-268
- Chiesa S., Scalici M., Negrini R., Gibertini G., Marzano F. 2011. Fine-scale genetic structure, phylogeny and systematics of threatened crayfish species complex. Molecular Phylogenetics and Evolution, 61: 1-11
- Coleman A.W. 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. Trends in Genetics, 19, 7: 370–375
- Costa F.O., Henzler C.M., Lunt D.H., Whiteley N.H., Rock J. 2009. Probing marine *Gammarus* (Amphipoda) taxonomy with DNA barcodes. Systematics and Biodiversity, 7, 4: 365–379
- Costello M.J, Wilson S.P, Houlding B. 2012. Predicting total global species richness using rates of species description and estimates of taxonomic effort. Systematics Biology, 61: 871– 883
- Crandall K.A., Harris J., Fetzner J.W. 2000. The monophyletic origin of freshwater crayfish estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. Proceedings of the Royal Society of London, Series B, 267: 1679-1686
- Crandall K. A. 2006. Applications of phylokenetics to issues in freshwater crayfish biology. Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture, 380-381: 953-964
- Cracraft J. 1983. Species concepts and speciation analysis. V: Current Ornithology. Johnson R. F. (ed.). New York, Plenum Press: 159-187
- Darwin C. 1859. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. 1st ed. London, John Murray: 373 str.
<http://darwin-online.org.uk/content/frameset?itemID=F373&viewtype=side&pageseq=1>
(11.12.2015)

- Dawkins R. 2006. Sebični gen. Ljubljana, Mladinska knjiga: 406 str.
- Dercourt J., Zonenshain L.P., Ricou L.E., Kazmin V.G., Le pichon X., Knipper A.L., Grandjacquet C., Sbortshikov I.M., Geyssant J., Lepvrirer C., Pechersky D.H., Boulin J., Sibuet J.C., Savostin L.A., Sorokhtin O., Westphal M., Bazchenov M.L., Lauer J.P., Biju Duval B. 1986. Geological evolution of the Tethys belt from Atlantic to the Pamirs since the Lias. *Tectonophysics*, 123, 1-4: 241-315
- de Queiroz K. 2005. A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proceedings of the California Academy of Science*, 56: 196-215
- Dieguez-Uribeondo J., Royo F., Souty-Grosset C., Ropiquet A., Grandjean F. 2008. Low genetic variability of the white-clawed crayfish in the Iberian Peninsula: its origin and management implications. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 18: 19-31
- Dixon C.I.T, Ahyong S.T., Schram F.R. 2003. A new hypothesis of decapod phylogeny. *Crustaceana*, 76: 935-975
- Edwards S.V. 2009. Is a new and general theory of molecular systematics emerging. *Evolution*, 63, 1: 1-19
- Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17, 6: 368-376
- Fetzner J.W, Crandall K.A. 2002. Genetic Variation. V: Biology of Freshwater Crayfish. Oxford, Blackwell Science Ltd.: 291-326
- Fitch W. M, Margoliash E. 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science* 155, 3760: 279-284
- Flot J.-F., Couloux A., Tillier S. 2010. Haplowebs as a graphical tool for delimiting species: a revival of Doyle's "field for recombination" approach and its application to the coral genus *Pocillopora* in Clipperton. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 372: 1-14, doi: 10.1186/1471-2148-10-372

- Flot J.-F., Blanchot J., Charpy L. 2011. Incongruence between morphotypes and genetically delimited species in the coral genus *Stylophora*: phenotypic plasticity, morphological convergence, morphological stasis or interspecific hybridization? BMC Ecology, 11: 22-28, doi:10.1186/1472-6785-11-22
- Fratini S., Zaccara S., Barbaresi S., Grandjean F., Souty-Grosset C., Crosa G., Gherard F. 2005. Phylogeography of the threatened crayfish (genus *Austropotamobius*) in Italy: implications for its taxonomy and conservation. Heredity, 94: 108-118
- Frankel O. H., Soulé M. E. 1981. Conservation and Evolution. Cambridge, Cambridge University Press: 327 str.
- Gaston K.J., David R. 1994. Hotspots across Europe. Biodiversity Letters, 2: 108–116
- Ghia D., Nardi P. A., Negri A., Bernini F., Bonardi A., Fea G., Spairani M. 2006. Syntopy of *A. pallipes* and *A. italicus*: genetic and morphometrical investigations. Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture, 380-381: 1001-1018
- Govedič M. 2006. Potočni raki Slovenije: razširjenost, ekologija, varstvo. Miklavž na Dravskem polju, Center za kartografijo favne in flore: 26 str.
- Gouin N., Grandjean F., Pain S., Souty-Grosset C., Reynolds J. 2003: Origin and colonization history of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes*, in Ireland. Heredity, 91: 70–77
- Gould S.J. 2002. The Structure of Evolutionary Theory. Harvard, The Belknap Press of Harvard University Press: 1433 str.
- Grandjean F., Harris D. J., Souty-Grosset C., Crandall K. A. 2000a. Systematics of the European endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (Decapoda: Astacidae). Journal of Crustacean Biology, 20: 522-529
- Grandjean F., Souty-Grosset C. 2000b. Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes*. Conservation Genetics, 1: 309-319

Grandjean F., Bouchon D., Souty-Grosset C. 2002. Systematics of the European endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (Decapoda: Astacidae) with a re-examination of the status of *Austropotamobius berndhauseri*. Journal of Crustacean Biology, 22: 677-681

Griffiths H. I., Kryštufek B., Reed J. M. 2004. Balkan Biodiversity. Pattern and Process in the European Hotspot. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 167 str.

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: 167-172

Hall B.G. 2011. Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual. Bellingham, Bellingham Research Institute: 282 str.

Hewitt G.M. 1999. Post-glacial recolonization of European biota. Biological Journal of the Linnean Society, 68: 87–112

Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B, Biological Science, 270, 1512: 313-321

Hoban S., Vernes C. 2012. Challenges in global biodiversity conservation, and solutions that cross sociology, politics, economics, and ecology. Biology Letters, 8, 6: 897–899, doi: 10.1098/rsbl.2012.0596

Holdich D.M. 2002. Present distribution of crayfish in Europe and some adjoining countries. Bulletin Francais de la Pesce et de la Pisciculture, 367: 611-650

Hwang U.W., Kim W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. The Korean Journal of Parasitology, 37, 4: 215–228

Huxley T.H. 1880. The Crayfish. An introduction to the study of zoology. The International scientific series. New York, D. Appleton and Company.
<http://www2.biology.ualberta.ca/palmer/thh/crayfish.htm> (11.12.2015)

Jamieson B.G.M. 1991. Ultrastructure and phylogeny of crustacean spermatozoa. Memoirs of the Queensland Museum, 31: 109-142

Jiggins in Mallet J. 2000. Bimodal hybrid zones and speciation. Trends in Ecological Evolution, 15, 6: 250-255

Karaman M.S. 1929. Die *Potamobiiden* Jugoslaviens. Glasnik zemaljskog muzeja u Bosni i Hercegovini, 41: 147–150

Karaman M.S. 1962. Ein Beitrag zur Systematik der Astacidae (Decapoda). Crustaceana, 3: 173–191

Kartavtsev Y. P., J.-S. Lee. 2006. Analysis of nucleotide diversity at the cytochrome b and cytochrome oxidase 1 genes at the population, species, and genus levels. Russian Journal of Genetics, 42, 4: 341–362

Klobučar G. I., Podnar M., Jelić M., Franjević D., Faller M., Štambuk A., Gottstein S., Simić V., Maguire I. 2013. Role of the Dinaric Karst (western Balkans) in shaping the phylogeographic structure of the threatened crayfish *Austropotamobius torrentium*. Freshwater Biology, 58: 1089-1105

Keller A. 2010. Secondary (and tertiary) structure of the ITS2 and its application for phylogenetic tree reconstructions and species identification. Dissertation. Würzburg, Bayerischen Julius-Maximilians-Universität: 291 str.

https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/files/4783/Dissertation_Online.pdf (11.12.2015)

Kress W. J., Erikson D. L. 2012. DNA barcodes: methods and protocols. Methods in Molecular Biology, 858: 3-8, doi: 10.1007/978-1-61779-591-6

Krstić N., Savić L., Jovanović G., Bodor E. 2003. Lower miocene lakes of the Balkan peninsula. Acta Geologica Hungarica, 46, 3: 291-299

Kouba A., Petrušek A., Kozák P. 2014. Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, 413, 5: 1-31, doi: 10.1051/kmae/2014007

Largiadèr C. R., Herger F., Lörtscher M., Choll A. 2000. Assessment of natural and artificial propagation of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* species complex) in the Alpine region with nuclear and mitochondrial markers. *Molecular Ecology*, 9: 25–37

Lefébure T., Douady C. J., Gouy M., Gilbert J. 2006. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of molecular threshold to help species delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 435-447

Lörtscher M., Stucki T. P., Clanüna M., Scholl A. 1997. Phylogeographic structure of *Austropotamobius pallipes* populations in Switzerland. *Bulletin Francais de la Pesce et de la Pisciculture*, 347: 649-661

Maddison W.P., Knowles L.L. 2006. Inferring Phylogeny Despite Incomplete Lineage Sorting. *Systematic Biology*, 55, 1: 21–30, doi: 10.1080/10635150500354928

Machino Y., Füreder L., Laurent P.J., Petutchnig J. 2004. Introduction of the White-Clawed Crayfish *Austropotamobius pallipes* in Europe. *Berichte der naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins in Innsbruck*, 85: 223-229

Machino Y., Holdich D. M. 2006. Distribution of crayfish in Europe and adjacent countries: updates and comments. *Freshwater Crayfish*, 15: 292-323

Mallet J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, 5: 229–237

Martin J.W., Davis G.E. 2001. An updated classification of the recent Crustacea. Science series No. 39. Los Angeles, Natural History Museum of Los Angeles County: 124 str.

Mayr E., Diamond J., Simoniti I., Weber A., Wilkins J.S. 2008. Filozofija evolucije. Ljubljana, Fakulteta za družbene vede: 366 str.

Moritz C. 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: critical review. *Molecular Ecology*, 3: 401-411

Moritz C., Cicero C. 2004. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLoS Biol* 2, 10: e354, doi:10.1371/journal.pbio.0020354

- Nascetti G., Andreani P., Santucci F., Iaconelli M., Bullini L. Struttura genetica di popolazioni italiane di gambero di fiume (*Austropotamobius pallipes*) e strategie per la sua conservazione. Societa Italiana di Ecologia, 18: 205-208
- Ortman A.E. 1902. The geographical distribution of freshwater decapods and its bearing upon ancient geography. Proceedings of the American Philosophical Society, 41: 267-400
- Pedraza-Lara C., Alda F., Carranza S., Doadrio I. 2010. Mitochondrial DNA structure of the Iberian populations of white-clawed crayfish, *Austropotamobius italicus italicus* (Faxon, 1914). Molecular Phylogeny and Evolution, 57: 327-342
- Posada D., Crandall K. A. 2001. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. PNAS, 98, 24: 13757-13762,
doi: 10.1073/pnas.241370698
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. Molecular Phylogeny and Evolution, 25: 1253-1256
- Puillandre N., Modica M.V., Zhang Y., Sirovich L., Boisselier M.-C., Cruaud C., Holford M., Samadi S. 2012. Large-scale species delimitation method for hyperdiverse. Molecular Ecology, 21: 2671–2691
- Rannala B., Yang Z. 2008. Phylogenetic inference using whole genomes. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 9: 217-231
- Ratnasingham S., Hebert P.D.N. 2007. BOLD: The barcode of life data system. Molecular Ecology Notes. 1, 7, 3: 355–364, doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x
- Rozas J., Rozas R., 1995. DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating Population Genetics parameters from DNA sequence data. Computer Application and Bioscience, 11: 621-625
- Saitou N, Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4, 4: 406-25
- Santucci F., Iaconelli M., Andreani P., Cianchi R., Nascetti G., Bullini L. 1997. Allozyme diversity of European freshwater crayfish of the genus *Austropotamobius*. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture, 347: 663–676

- Scalici M., Bravi R. 2012. Solving alpha-diversity by morphological markers contributes to arranging the systematic status of a crayfish species complex (Crustacea, Decapoda). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 50, 2: 89–98
- Scholtz G. 1993. Teloblasts in decapod embryos: an embryonic character reveals the monophyletic origin of freshwater crayfishes (Crustacea, Decapoda). *Zoologischer Anzeiger*, 230: 45-54
- Scholtz G. 2002. Phylogeny and evolution. V: *Biology of Freshwater Crayfish*. Holdich D. M. (ed.). Oxford, Blackwell Science Ltd.: 30-35
- Scholtz G., Richter S. 1995. Phylogenetic systematics of the reptantian Decapoda (Crustacea, Malacostraca). *Zoogical Journal of the Linnean Society*, 113: 289-328
- Schubart C. D., Huber M. G. J. 2006. Genetic comparison of German populations of the stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* (Crustacea: Astacidae). *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture*, 380-381: 1019-1028
- Simpson B.B., Cracraft J. 1995. Systematics: the science of biodiversity. *Bio-Science*, 45: 670–672
- Souty-Grosset C., Holdich D. M., Noël P. Y., Reynolds J. D., Haffner P. 2006. *Atlas of crayfish in Europe*. Paris, Publications Scientifiques du MNHN: 187 str.
- Stage D.E., Eickbush T.H. 2009. Origin of nascent lineages and the mechanisms used to prime second-strand DNA synthesis in the R1 and R2 retrotransposons of *Drosophila*. *Genome Biology* 10, 5, R49: 1-17, doi:10.1186/gb-2009-10-5-r49
- Stefani F., Zaccara S., Delmastro G. B. Buscarino M. 2009. The endangered white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* (Decapoda, Astacidae) east and west of the Maritime Alps: a result of human translocation? *Conservation Genetics*, 12, 1: 51-60, doi:10.1007/s10592-009-9986-x
- Tamura K., Stecher G., Peterson D. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725–2729

Trontelj P., Machino Y., Sket B. 2005. Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial CO1 gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34: 212-226

Trontelj P. 2009. Sistematski pogled na biodiverziteto. V: *Biodiverziteta - raznolikost živih sistemov*. Strgulc-Krajšek S., Vičar M., Vilhar B. (ur.). Ljubljana, Zavod RS za šolstvo: 29-35

Vaidya G., Lohman D.J., Meier R. 2011. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27, 2: 171–180

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, doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02745.x

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

Vigneux E., Keith P., Noel P. 1993. *Atlas préliminaire des Crustaces Décapodes d'eau douce de France*. Paris, Muséum national d'histoire naturelle, Secrétariat de la faune et de la flore: 56 str.

Vogler A.P., Monaghan M.T. 2006. Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45, 1: 1-10, doi: 10.1111/j.1439-0469.2006.00384.x

Wiens, J. J. 2003. Missing data, incomplete taxa, and phylogenetic accuracy. *Systematic Biology*, 52: 528–538

- Wiesner R.J., Ruegg J.C., Morano I. 1992. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction, copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochemistry and Biophysics*, 183, 2: 553–559
- Woley S. M., Posada D., Crandall K. 2008. A comparison of phylogenetic network methods using computer simulation. *PLoS ONE*, 3, 4: 1-12, doi: 10.1371/journal.pone.0001913
- Xia X., Xie Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92: 371-373
- Yang Z., Rannala B. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 7: 717-724
- Zaccara S., Stefani F., Galli P., Nardi P. A., Crosa G. 2004. Taxonomic implication in conservation managment of white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) (Decapoda, Astacidae) in Northern Italy. *Biological Conservation*, 120: 1-10
- Zhang J., Kapli P., Pavlidis P., Stamatakis A. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29: 2869–2876
- Zuckerkandl E., Pauling L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*, 8, 2: 357-366

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Petru Trontlju, ki mi je kljub temu, da nisem bila mlada raziskovalka, zaupal nalogo in me strpno spremjal skozi ves projekt.

Za uvajanje v laboratorijsko delo ter prve ure filogenetike in sistematike potočnih rakov se posebej zahvaljujem Yoichiju Machino, strokovnjaku na področju sistematike potočnih rakov.

Svojemu možu Saštu se najlepše zahvaljujem za razumevanje, ljubečo podporo in tehnično pomoč pri pripravi pisnega dela naloge.

Svoji sestri Kseniji se zahvaljujem za lektoriranje ter spodbudne besede.

Predsedniku komisije za oceno in zagovor doc. dr. Rudi Verovnik ter članoma komisije izr. prof. dr. Eleni Bužan in viš. znan. sod. dr. Alešu Snoju se iskreno zahvaljujem za pregled naloge ter komentarje.

Za prve ure spoznavanja filogenetskih programov se zahvaljujem raziskovalki Ajdi Moškrič.

Svojima otrokom se zahvaljujem za številne pisane risbice potočnih rakov ter zavzeto poslušanje in »uvajanje« v pisani svet narave in naravovarstvo.

PRILOGE

Priloga A: Oznaka vzorcev *A. pallipes* sensu lato, vzorčna mesta, opredelitev v haplotipsko skupino, oznake za posamezni genetski označevalec (CO1, 16S, ITS2, združene) in koordinate mesta vzorčenja.

HAPLOTIP	HAPLOGROU P	TAKSON	COI sekvence	16S sekvence	ITS2 sekvence	CONCAT ENATED	REF. ST. AY61	AVTOR/LETO	LOKACIJA	LAT/LON G
APP_A2	NW Italy	A.i.carint hiacus		A2		/	1184	Fratini in sod., 2005	Lambro, Piemonte, IT	45.34823 9.34252
APP_Arroyo_E				Arroyo_E				Iaconelli, 2001 Pedraza-Lara in sod., 2010		46.16986 9.87877
APP_18_ADD	Istra1*	A.i.carsi cus	APP_18_ADDA			/	2261	Sondrio, Adda, Italy		46.16986 9.87877
APP_65_ADD	Istra1*	A.i.carsi cus		APP_65_ADDA	A	/	22597	Pedraza-Lara in sod., 2010	Sondrio, Adda, Italy	46.16986 9.87877
APP_ADDA_I	Istra1*	A.i.carsi cus		APP_65_ADDA_IT	A	COI+16S		Pedraza-Lara in sod., 2010	Sondrio, Adda, Italy	46.16986 9.87877
APP_A11	W Europe	pallipes A.		A11		/	1199	Fratini et al. (2005)	Borbera-Lagoscuro, Piemonte, I	44.34390 7.90720
APP_A12	W Europe	pallipes A.i.carsi		A12		/	1200	Fratini et al. (2005)	Piemon, I	44.34390 7.90720
APP_A16	Istra1	cus		A16		/	1196	Fratini et al. (2005)	Lambro 5, Lombardia, I	45.83815 9.24276
APP_A17	Istra1	cus		A17		/	1197	Fratini et al. (2005)	Lambro 5, Lombardia, I	45.83815 9.24276
APP_A18	Istra1	A.i.carsi cus		A18		/	1198	Fratini et al. (2005)	Lago Caldonazzo, Trentino, I	45.99835 11.26741
APP_A22	W Europe	pallipes A.		A22		/	1202	Fratini et al. (2005)	Arvigo, Liguria,I	44.47534 8.94282
APP_A23	W Europe	pallipes A.i.carsi		A23		/	1203	Fratini et al. (2005)	Nenno, Liguria, I	44.55825 9.02878
APP_A24	W Europe	pallipes A.i.carsi		A24		/	1204	Fratini et al. (2005)	Montenotte, Liguria, I	44.33841 8.34391
APP_A4	Istra1	cus		A4		/	1186	Fratini et al. (2005)	Rosandra, Friuli, I	45.63123 9.13334
APP_A7	NW Italy	us		A7		/	1188	Fratini et al. (2005)	Farferata, Toscana, I	43.77105 11.24862
APP_A8	NW Italy	A.i.italic us		A8		/	1189	Fratini et al. (2005)	Lama, Emilia-Romagna, I	44.34036 11.26921
							id.	Fratini et al. (2005)	Stagiom, Toscana, I	39.68486
APP_ARNO_I	NW Italy	A.i.carint hiacus	APP_I_ARNO			/	id.	Fratini et al. (2005)	Coscile, Calabria, I	16.31285 44.72268
APP_BAT2_I	SEAlps+Wbalk ans/Apennine	A.meridi onalis A.i.carsi cus				/	HM6 22618	Pedraza-Lara, 2010	Arno, I	11.27428 40.00000
APP_BEL2	Istra1					/	AY12 1112	Iaconelli, 2001	Castelluccio, Potenza, IT	15.96667
APP_Belluno_IT	SEAlps+Wbalk ans	A.meridi onalis A.meridi onalis	APP_Belluno			/	AY12 1127	Iaconelli, 2001	n/a	46.14246
							*		Rio Cavalli, Belluno, IT	12.21671
APP_Cavallib elluno_IT	SEAlps+Wbalk ans					COI+16S +ITS2	*		Rio Cavalli, Belluno, IT	46.14246 12.21671
			APP_Belluno							
				RioCavalli_I_4 (id.):						
				Moosbach1,					Moosbach1, DE	49.58855 12.40897
				RioCavalli					Rio Cavalli, Belluno, IT	46.14246 12.21671
					RioCavalliIT4 (id.)				Rio Cavalli, Belluno, IT	46.14246 12.21671
				Rio Triva						
					Rio Cavalli					
APP_Bisignano_IT	Apennine*	A.i.meri dionalis	Bisignano_I_7 (id.):			/				
				A14		/	AY61 1193	Fratini et al. (2005)	San Antuono, Campania, I	40.49255 15.52332
				Bisignano, I		/		Iaconelli, 2001	Bisignago, I	39.51258 16.28703
				Grognado, I		/		Iaconelli, 2001	Grognado, I	45.62241 9.54065
APP_Borenitz_eB_AT	SEAlps+Wbalk ans	A.i.meri dionalis A.i.carint hiacus	APP_SE-Alps	BorenitzB_A T	BorenitzBA (F)	COI+16S +ITS2	*		Weißbriach, Hermagor, AT	46.68469 13.25253
APP_BRAS5_I	NW Italy					/	AY12 1116	Iaconelli, 2001	Bracchio, Verbania, IT	45.96577 8.45330
APP_Bracana_HR	Apennine /Istra2	A.i.meri dionalis	APP_BracanaI			/	AY66 7109	Trontelj, 2005	Bračana potok, Buzet, HR	45.40756 13.96513
APP_Bracana_P_HR	Apennine/Istra2	A.i.meri dionalis	APP_Bracana	BracanaP, HR	BracanaPHR (D, G)	COI+16S +ITS2	*		Bračana potok, Buzet, HR	45.40756 13.96513
APP_Burgos_ES	NW Italy	A.i.carint hiacus	Burgos-2			/	JF430	Matallanas, 2010	Burgos, SP	42.34399 - 3.69961
APP_Citeles_FR	W Europe	pallipes	APP_France	Citelles_Ren_F	CitellesF Ruisseau.d.MoulinF:	COI+16S +ITS2	*		Citelles, F	44.48677 4.90665
APP_Comane_FR	W Europe	A. pallipes	APP_France	Comane_Ren_F (DK)	Comane, Ruisseau.d.MoulinF	COI+16S +ITS2	*		Comane, F	44.79437 5.37151
APP_Cres_HR	SEAlps+Wbalk ans	A.i.meri dionalis	APP_Cres			/	AY66 7111	Trontelj, 2005	Vransko jezero, Island	44.85700 14.39754
APP_Cres2_HR	SEAlps+Wbalk ans	A.i.meri dionalis	APP_Cres	APP_Cres		/	JF430		Vransko jezero, Island	44.85700 14.39754
APP_CST14_I	Apennine*	A.i.meri dionalis	APP_CST14			/	AY12 1111	Iaconelli, 2001	Las Illas, Perpignan, FR	42.68363 2.90715
APP_Cuenca_ES	NW Italy	A.i.carint hiacus	APP_Cuenca			/	JF430	Matallanas, 2010	Cuenca, SP	40.07039 - 2.13742
APP_Cuenca2_ES	NW Italy	A.i.carint hiacus	APP_Cuenca-2			/	568		Cuenca, SP	40.07039 - 2.13742
APP_CUG2_I	NW Italy	A.i.carint hiacus	APP_CUG2			/	573	Matallanas, 2010	Cuenca, SP	46.25298 2.13742
APP_Dalmatia_HR	SEAlps+Wbalk ans	A. i. meridion alis	APP_Dalmatia (id.):			/	AY12 1114	Iaconelli, 2001	Claro, Bellinzona, CH&IT	9.02308
				id.		/	AY66 7106	*/Trontelj in sod., 2005	Jezero Modro Oko, Ploče, HR	43.05631 17.43102

APP_Dalmatia_2_HR	SEAAlps+Wbalkans	A. i. meridionalis	id.	AY66 7106 AY12 1120	Trontelj in sod., 2005	Konavoski Dvori, Dubrovnik, HR Vrba, Donje Postinje, Drmniš, HR	42.65066 18.09442 43.86029 16.15586
			APP_Dalmatia	CO1+16S	*	Jezero Modro Oko, Ploče, HR	43.05631 17.43102
APP_Dragonja_SI	Istra I*	A.i.carsicus	JezeroModroOk郝_HR		*	Dragonja River, Piran, SI	45.47053 13.60418
			APP_Dragonja				
			Dragonja_SLO				
APP_F17	W Europe	A. pallipes	APP_F17	/	AF23 7608 AF23	Grandjean et al. (2000)	?
APP_F337	W Europe	A.pallipes	F337	/	7595	Grandjean in sod., 2002	Val Renard, Orne, F
			A27	/		Fratini et al. (2005)	Val Renard, Orne, F
APP_F463	NW Italy	A.i.italicus	F463		AF23 7591 AF23	Grandjean et al. (2000)	48.76659 -
APP_F583	NW Italy	A.i.carintiacus	F583		7590	Fratini et al. (2005) and Grandjean et al. (2000)	0.19712 48.76659 -
APP_F380			F380	/	AF23 7607	Grandjean et al. (2000)	0.19712
APP_F556	W Europe	A. pallipes	F556	/	AF23 7606	Grandjean et al. (2000)	?
APP_France	W Europe	A. pallipes	APP_France	/			
			Ruisseau.d.Moulin, FR				
			id.	/	AF52 6891	Iaconelli, 2001	Ruisseau.d.Moulin, FR
			id.	/	AF52 6891	Iaconelli, 2001	Castelbianco, Imperia, IT
			id.	/	AY66 7115	Longeau River, Fresnes-en-Woëvre, FR	44.88335 -
			id.	/	AY66 7115	Opfingen, Freiburg im Breisgau, DE	0.46842 44.10929 8.07380
			id.	/	AF52 6891	Trontelj in sod., 2005	43.73366
			id.	/	AY66 7115	Trontelj in sod., 2005	3.31398
			id.	/	AY66 7115	Trontelj in sod., 2005	48.75720 2.32624
			id.	/	AF52 6891	Trontelj in sod., 2005	45.61294
			id.	/	AY66 7115	Miagliano, Biella, IT	8.04416
			id.	/	AF52 6891	Trontelj in sod., 2005	43.63600 6.97696 52.48282
			id.	/	AY66 7115	Moulin des Adrets Creek, Brignoud, FR	1.22849
APP_France2	W Europe	A. pallipes	CO1+16S				
			APP_France				
			Castelbianco_I				
			_12 (id.):				
			Castelbianco, IT				
			Ruisseau de Vassy, F				
			Miagliano, IT				
			CO1+16S				
			+ITS2				
APP_France3	W Europe	A. pallipes	EauNoire_Rhne_F_11 (id.):		*	Ruisseau.d.Moulin, FR	44.88335 -
			APP_France				0.46842
			EauNoire_Rhn				
			e_F_11 (id.):				
			EauNoire		*	Eau Noire, FR	44.88335 -
			Ruisseau.d.Moulin		*	Ruisseau.d.Moulin, FR	0.46842
							46.03578 6.93704 44.88335 -
			APP_A5				4.75637
			Ruisseau.d.MoulinF (id.):				
			Ruisseau.d.MoulinF		*	Ruisseau.d.Moulin, FR	
			Comane		*	Comane, FR	
APP_Freiburg_D	W Europe	A. pallipes	FreiburgimBreisgau_D				
APP_Gaudes1_FR	Apennine*	A.i.meridionalis	APP_Gaudes_6 (id.):				
			Gaudes		*		
			17_MUGA_SAL		*		
APP_Gaudes2_FR	Apennine*	A.i.meridionalis	HM6 22613	Pedraza-Lara in sod., 2010		Ruisseau des Gaudes (Isere), Rhone, F	45.29290 5.90320
			APP_Gaudes_6				
			RuisseaudesGaudes;Ren:F				
APP_Gerona_ES	NW Italy	A.i.carintiacus	APP_Gerona	JF430 569 AY12 1124 AY12 1113	Matallanas, 2010 Iaconelli, 2001 Iaconelli, 2001	Girona, SP Leale Avasinis, Gemona del Friuli, IT Gubbio, Perugia, IT	45.29290 5.90320 41.97940 2.82143 46.27527 13.14268 43.35132 12.57532
APP_GIT3_IT	SEAAlps+Wbalkans	A.i.meridionalis	APP_GIT3				
APP_GUB4_IT	Apennine*	A.i.meridionalis	APP_GUB4				
APP_Hypolith_Bach_IT	NW Italy	A.i.carintiacus	APP_Tyrol_2 (id.):	CO1+16S +ITS2	*	Hypolith Bach Lana BZ, IT	46.61159 11.16295 44.72268
			APP_Tyrol				
			APP_2 ARNO	HM6 22618	Pedraza-Lara, 2010	Arno, I	11.27428

				Krebsbach_I_1 (id.):				
				A1	AY61 1183	Fratini et al. (2005)	Tanaro, Piemonte, I	45.005.556
				HypolithBach	*		Hypolith Bach Lana BZ, IT	46.61159 11.16295
				Krebsbach	*		Krebsbach, Lana BZ, IT	46.61159 11.16295
				KrebsbachAT2 (id.):	*		Krebsbach, Lana BZ, IT	46.61159 11.16295
				Krebsbach			Castelo de algoso, tortulhas, P	41.46148 - 6.57936
APP_Licenza Roma_IT APP_Longeau R_FR	Apennine* W Europe	A.i.meri dionalis A. pallipes	APP_Licenza-Roma	Tortulhas, P	FJ160 748	*	Lizenca, Roma, IT	42.07278 12.90045
						COI+16S		
			APP_France			*		44.88335 -
				RiviereLongeau_Moselle_F_13 (id.):		*	Ruisseau.d.Moulin, FR	0.46842 44.88335 -
				RiviereLongea u_Moselle_F		*	Ruisseau.d.Moulin, FR	0.46842 RiviereLongeau_Moselle_- F
				F674			Grandjean in sod., 2002	49.13125 5.81381
APP_LS52	W Europe	A. pallipes A.	APP_LS52		AY52 1294	Zacara et al. (2004)	Vignole A., Borbera, Po drainage, I	44.70852 8.89137
APP_LS53	W Europe	pallipes	LS53		AY52 1296	Zacara et al. (2004)	Vignole A., Borbera, Po drainage, I	44.70852 8.89137
APP_Mar	Istra1*	A.i.carsi cus	Mar		AY52 1292	Zacara et al. (2004)	Monte Barro, Adda, Po drainage, I	45.83250 9.37917
APP_Mc1_IT	Istra1*	A.i.carsi cus	APP_Mc1		EU07 7570	Cataudella, Granjean, 2007		unpublished
APP_Mc2_IT	Apennine*	A.i.meri dionalis	APP_Mc2		EU07 7567	Cataudella, Granjean, 2007		unpublished
APP_Mc3_IT	Apennine*	A.i.meri dionalis	APP_Mc3		EU07 7573	Cataudella, Granjean, 2007		unpublished
APP_Mc4_IT	Appennine	A.i.meri dionalis	APP_Mc4		EU07 7566	Cataudella, Granjean, 2007		unpublished
APP_Mc5_IT	Apennine*	A.i.meri dionalis	APP_Mc5		EU07 7568	Cataudella, Granjean, 2007		unpublished
APP_Mc6_IT	Apennine*	A.i.meri dionalis	APP_Mc6		EU07 7569	Cataudella, Granjean, 2007		unpublished
APP_Mc7_IT	Apennine*	A.i.meri dionalis	APP_Mc7		EU07 7571	Cataudella, Granjean, 2007		unpublished
APP_Mc8_IT	Apennine*	A.i.meri dionalis	APP_Mc8		EU07 7572	Cataudella, Granjean, 2007		unpublished
APP_MIR9_H R	Apennine*Istr a2	A.i.meri dionalis	APP_MIR9		AY12 1119	Iaconelli, 2001		Buzet, HR 13.96513
APP_Moosbac hl_IT	SEAlps+Wbalk ans	A.i.meri dionalis			COI+16S	*		49.58855 Moosbachl, DE 12.40897
			APP_Moosbachl					
				RioCavali_I_4 (id.):				
				Moosbachl,			Moosbachl, DE	49.58855 12.40897
				RioCavalli Ruisseau.Hay e_Moselle_F	/	*		46.14246
APP_Moselle_F	W Europe	A.pallipe s	16_MUGA_SAL (id.):		HM6 22612	Pedraza-Lara in sod., 2010	Rio Cavalli, Belluno, IT	12.21671 49.09838
APP_16_MU GA_SAL_ES	Apennine*	A.i.meri dionalis	16_MUGA_SAL				Moselle, FR	6.55276 41.38827 - 6.19911
							Muga de Sayago, SP	
				16_MUGA_SAL				
				APP_APc_Rdc7	/			
				APP_APc_Rdc_1	/	AB44 3445	Aceto in sod., 2008	41.07235 Caserta, IT 14.33113
APP_54_MU GA_ES	Apennine*	A.i.meri dionalis	APP_54_MUG A_ES (id.):		/	HM6 22596	Pedraza-Lara in sod., 2010	41.38827 - Muga de Sayago, SP 6.19911
				A_13	/	AY61 1192	Fratini in sod., 2005	
				RuisseaudeGau des_Ren:F	/		Chartreuse, Ruisseau des Gaudes (Isere, Ren), FR	48.01363 - 0.16886
				F465	/	AF23 7595	Grandjean in sod., 2002	
APP_MUGA_ SAL_ES	Apennine*	A.i.meri dionalis	16_MUGA_SAL			AB44 3451	Aceto in sod., 2008	41.07235 Caserta, IT 14.33113
APP_Mul	W Europe	A. pallipes	APP_Mul		COI+16S 1285	AY52	Rigoroso, Scrivia, Po drainage, I	44.65445 8.94737
APP_Musnica _BiH	SEAlps+Wbalk ans	A.i.meri dionalis			+ITS2	*		
			APP_Dalmacija					
				ZetaRiver_CG _10 (id.):				
				MušnicaBiH KonavoskiDv oriHR		*	Mušnica, BiH	43.14617 18.54946
				ZetaRiver		*	Konavoski Dvori, Dubrovnik, HR	42.65066 18.09442
						*	Bern, CH	42.46725
							Moosbach, Ursenbach, Bern, CH	46.54254
							Paudéze, Les Fiolettes, Vaud, CH	46.54140 6.71878
APP_N3	W Europe	A. pallipes	N3		AJ24 2702	Largiadér et al. (2000)		44.65445 8.94737
APP_N4	W Europe	A. pallipes	N4		AJ24 2703	Largiadér et al. (2000)		47.16382 7.23782
				id.		id.	Largiadér et al. (2000)	7.37931
				id.		id.	Largiadér et al. (2000)	46.54140 6.71878
APP_NennoG enova_IT	W Europe	A. pallipes	APP_Nenno-Genova		FJ160 744	Chiesa, 2011	Nenno, Genova, IT	44.55825 9.02878
APP_Odolina_ SLO	Istra1*	A.i.carsi cus	Odolina_SLO; Botazzo_IT		AY12 1121	Iaconelli, 2001	Odolina, Kozina, SLO	45.59418 14.02796
APP_Oapska R_SI								

APP_6_Spain APP_Redipolli s_E_3	NW Italy	A.i.carint hiacus	APP_6_Spain	Redipollos_E _3 (id.):	/	HM6 22606	Pedraza-Lara, 2010	?	22.97642 - 5.00590 37.34689 -
				Sillar, ES	/		Iaconelli, 2001	Redipollos, ES	3.33106 Castelo de algoso, tortulhas, P
				Tortulhas, P	/		*		41.46148 - 6.57936 41.59713
				Sant genis;ES,	/		*	Sant genis;ES,	1.56415 37.17734 - 3.59856
				Granada, ES	/	HM6 22595	Iaconelli, 2001 Pedraza-Lara in sod., 2010	Granada, ES	
				A. italicus	/				
				F765	/		Grandjean in sod., 2002		
APP_Spain	NW Italy	A.i.italic us	APP_SPAIN_3 (id.):			FJ897 840 JF430			39.46991 - 0.37629 40.34569 -
	NW Italy		Valencia, SP			571	Matallanas, 2010	Valencia, SP	1.10643
	NW Italy		Tereuel, SP			HM6 22603	Matallanas, 2010 Pedraza-Lara in sod., 2010	Tereuel, SP	
	NW Italy		8_Spain,			HM6 22607	Pedraza-Lara in sod., 2010	8_Spain,	
	NW Italy		11_Spain,			FJ897			41.38506
	NW Italy		Barcelona, SP			844	Matallanas, 2010	Barcelona, SP	2.17340
APP_Spain2	NW Italy	A.i.italic us	SPAIN_7			HM6 22608	Pedraza-Lara in sod., 2010		
	NW Italy		9_SPAIN			HM6 22614	Pedraza-Lara in sod., 2010		
	NW Italy		14_SPAIN			HM6 22615	Pedraza-Lara in sod., 2010		
	NW Italy		15_SPAIN			AY52			
APP_SS2	W Europe	A. pallipes	APP_SS2			1287	Zacara et al. (2004)	Gavi, Lemme, Po drainage,I	44.66838 8.76740
			id.				id.	Rossana, Varaita, Po drainage, I	44.51300 7.47060
			id.				id.	Serravalle S., Sesia, Po drainage, I	45.67847 8.31253
APP_STE4_IT APP_19_Teve re	SEAlps+Wbalk ans	A.i.meri dionalis	APP_STE4			AY12	Zacara et al. (2004)	Stella, Sterpo, Codroipo, IT	45.96139 12.97678
APP_62_TEV ERE	NW Italy	A.i.carint hiacus	APP_19_TEVERE		/	1125	Iaconelli, 2001		
APP_TEVER E	NW Italy	A.i.carint hiacus	62_TEVERE			HM6 22616	Pedraza-Lara in sod., 2010	Tevere, IT	42.66504 13.48966
	NW Italy	A.i.carint hiacus				HM6 22598	Pedraza-Lara in sod., 2010	Tevere, IT	42.66504 13.48966
			APP_19_TEVERE			COI+16S			
						HM6 22616	Pedraza-Lara in sod., 2010	Tevere, IT	
APP_Tortulha s_PT	NW Italy	A.i.italic us	62_TEVERE			HM6 22598	Pedraza-Lara in sod., 2010	Tevere, IT	42.66504 13.48966
						COI+16S +ITS2	*	Ribeiro Das Tortulhas, P	41.4667 - 6.5333
			APP_Iberic (id.)*						
			Rediopolis_ES (id.)*						
					KrebsbachIT2				
APP_TrivaBel luno_IT	SEAlps+Wbalk ans	A.i.meri dionalis				COI+16S +ITS2	*	Rio Triva, Sédico, Belluno, IT	46.14246 12.21671
			APP_Belluno						
				RioTriva					
				Vipava_SLO3 (DD)					
APP_Trebine _BiH	SEAlps+Wbalk ans	A.i.meri dionalis				COI+16S	*	Trebišnjica River, Trebinje, BiH	43.86015 18.36295
			APP_Trebine						
				Trebiniščica_B iH					
APP_Tyrol_A T	NW Italy	A.i.carint hiacus	APP_Tyrol_2 (id.):			5		Lake Plansee, Reutte, AT	
				Krebsbach			*	Krebsbach, Lana, BZ, IT	46.62739 13.37120
				APP_Tyrol			*	Hypolith Bach Lana BZ, IT	44.72268 46.1159
				APP_2_ARNO				Arno, I	44.72268 11.27428
APP_Udine_I T	SEAlps+Wbalk ans	A.i.meri dionalis	APP_Udine			HM6 22618	Pedraza-Lara, 2010		46.07107
APP_Valturca naBelluno_IT	SEAlps+Wbalk ans	A.meridi onalis	APP_Rio Valturcana- Belluno			FJ160	747	Chiesa, 2011	13.23458
		A.i.carint hiacus				FJ160	746	Chiesa, 2011	46.14246
APP_Var	NW Italy	A.i.meri dionalis	Var			AY52		Rio Valturcana, Belluno, I	12.21671
APP_VED15_ IT	SEAlps+Wbalk ans	A.i.meri dionalis	APP_VED15			1289	Zacara et al. (2004)	Vignole A., Borbera, Po drainage, I	44.70852 8.89137
APP_VIM2_1 T	Istra1*	A.i.carsi cus	APP_VIM2			AY12			46.24714
APP_VIP7_SI SI	SEAlps+Wbalk ans	A.i.meri dionalis	APP_VIP7			1123	Iaconelli, 2001	Vedronza, Tarcento, IT	13.24788
APP_Vipava_ SI	SEAlps+Wbalk ans	A.i.meri dionalis	APP_Vipava			AY12		Santuário, Imagna,	45.69826
APP_Vipava2_ _SI	SEAlps+Wbalk ans	A.i.meri dionalis				1122	Iaconelli, 2001	Bergamo, IT	9.67727
			APP_Vipava			AY12		Čehovini, Stanjel, Vipava,	45.81212
				Vipava_SLO_9		1126	Iaconelli, 2001	SI	13.88449
						AY66		Lonjerce, Mlake, Vipava,	45.81212
						7117	*/Trontelj in sod., 2005	SI	13.88449
							*	Vipava, SLO	45.81212
							*	Vipava, SLO	13.88449
							*	Vipava, SLO	45.81212
APP_Vipava3_ _SI	SEAlps+Wbalk ans	A.i.meri dionalis					*	Vipava, SLO	13.88449
			APP_VIP7					Vipava, SLO	45.81212
				Vipava_SLO_9				Vipava, SLO	13.88449
						AY66	7117	*/Trontelj in sod., 2005	45.81212
							*	Vipava, SLO	13.88449
							*	Vipava, SLO	45.81212
							*	Vipava, SLO	13.88449
							*	Vipava, SLO	45.81212
				Vipava_SLO3				Vipava, SLO	13.88449

Priloga B: Oznaka vzorcev *A. torrentium*, vzorčna mesta, opredelitev v haplotipsko skupino, oznake za posamezni genetski označevalec (CO1, 16S, ITS2, združene) in koordinate mesta vzorčenja.

HAPLOTIP		skupina	COI zaporedja	16S zaporedja	ITS2 zaporedja	zdržene	REF. ŠT.	Avtor	LOKACIJA	
APT_AldinackaB_SB		SB				CO1+ITS2		*	Aldinacka Brook, SB	43.54212 22.45150
			Aldinacka_Brook_SB							
					Grapca_SLO					
APT_Alsace_F	CSE	11-APT_Alsace (id.):			CO1+16S+ITS2			*	Bremmelbaechel Alsace, F	48.31818 7.44162 47.92130
		APT_Breisgau*				AY667141		Trontelj in sod., 2005	Freiburg im Breisgau, DE	7.74014
		h5				JF293409,		Klobučar in sod., 2012	Schubart in Huber, 2007	48.79045 11.49789 49.94591
		ht1, ht2				AM180942		Bavaria	Gailbach, Sarreguemines, FR	9.20670 47.50668
		Gailbach						*	Archbach Tyrol, A	10.72716 47.49251
		Archbach Tyrol						*	Haldensee Tyrol, A	10.56053
		Haldensee Tyrol								
			CSEEurope_10 (id.):							
			h10							49.95507
			Broumy							13.85227 49.94591
			GailBach							9.20670
			Archbach Tyrol					*	Archbach Tyrol, A	47.50668 10.72716 47.49251
			Haldensee Tyrol					*	Haldensee Tyrol, A	10.56053
				Alsace_F_2 (id.):						
				Broumy				*	Broumy, Česka	49.95507
				GailBach				*	Gailbach, Sarreguemines, FR	13.85227 49.94591
				Alsace_F_2				*	Bremmelbaechel Alsace, F	9.20670 48.31818 7.44162 44.86818
								*	Baile Herculane, RO	22.40851
APT_Baile_Herculanе_RO	CSE	Baile_Herculane_RO			CO1+16S+ITS2					
APT_Batania	SB	4-GR (id.):				AY667138		Trontelj in sod., 2005	Batania, GR	40.99720 22.57404
		APT_Batania								
APT_Batania2_GR	SB				CO1+16S+ITS2			*	Batania, GR	40.99720 22.57404
		4-GR(id.)								
			4-GR							
				Batania_GR						
APT_Bohinj	CSE	APT_Bohinj				AY667124		Trontelj in sod., 2005	Bohinjska Bela, Bled, SI	46.30057 13.94272
APT_Bratesina_SB	SB				CO1+16S+ITS2			*	Bratešina, Tara Mountains, SB	44.01652 21.00586
			Bratesina_Tara_mountains_SB							
				SBALKANS_3						
					Alsace_F_2					
APT_Bratislava_SK	CSE	Bystricka_Bratislava_SK			CO1+16S			*	Bratislava, SK	48.14589 17.10714
			CSEEurope_10							
APT_Breisgau	CSE	APT_Breisgau*				AY667141		Trontelj in sod., 2005	Freiburg im Breisgau, DE	47.92130 7.74014 49.94591
APT_Carinthia_AT	CSE				CO1+16S			*	Gailbach, FR	9.20670 46.58885
			APT_Carinthia					*	Nötsch, A	13.62151
				2_SLO						
APT_CentrSI	CSE	6-APTCentrSLO				AY667127		Trontelj in sod., 2005	River Iška, Ljubljana, SI	
APT_CentrSI2	CSE				CO1+16S+ITS2					
			6APTCentrSLO					*	Jazbinski Potok, Žerjav, SLO	46.48473 14.87451
			6APTCentrSLO					*	Piano di Fusine, Tarvisio, IT	46.50443 13.57996
			6APTCentrSLO					*	Rio dei Gamberi, tarvisio, IT	46.50443 13.57996
				2_SLO				*	Jazbinski Potok, Žerjav, SLO	46.48473 14.87451
				2_SLO				*	Piano di Fusine, Tarvisio, IT	46.50443 13.57996
				2_SLO				*	Rio dei Gamberi, tarvisio, IT	46.50443 13.57996
					Alsace_F_2			*	Jazbinski Potok, Žerjav, SLO	46.48473 14.87451
					Alsace_F_2			*	Piano di Fusine, Tarvisio, IT	46.50443 13.57996
					Alsace_F_2			*	Rio dei Gamberi, tarvisio, IT	46.50443 13.57996
								*	Jazbinski Potok, Žerjav, SLO	46.48473 14.87451

APT_KovacsP_HU	CSE		COI+16S+ITS2	*	Kovacs patak, Marianostriza, HU	47.65659 18.95519
		Kovacs_patak_Marianostriza_HU				
		CSEEurope_10				
		Alsace_F_2				
APT_Kragujevac_SB	SB	/	COI+16S	*	Zdraljica, Kragujevac, SB	44.07098 20.97546
		9-SB				
		SBALKANS_3				
APT_LimR(CG	CSE*		COI+16S+ITS2	*	Lim River, CG	43.02956 19.73869
		Lim_River_at_Murino(CG				
		LimR(CG				
		Kladanj_BiH				
APT_Maras1_GR	SB	APT_Maras	Maras_GR	AY667133	Trontelj in sod., 2005	39.28912 20.39756
APT_Maras2_GR	SB	APT_Maras	Maras_GR	COI+16S+ITS2	*	39.28912 20.39756
		Maras_GR	Maras_GR			
APT_Markova_MK	SB	MarkovaR_MK	ISS+ITS2		Markova, MK	41.04056 21.09056
APT_Milli1	SB	1-GR (id.); APT_Milli1	AY667135		Trontelj in sod., 2005	41.23495 23.39382
APT_Milli1c_GR	SB	1-GR(id.)	COI+16S+ITS2	*	Milli, GR	41.23495 23.39382
		7-GR (Milli-GR)	Koursovits_GR (BH)			
APT_Milli2	SB	3-GR (id.); APT_Milli2		*	Milli, GR	41.23495 23.39382
APT_Milli2c_GR	SB	3-GR(id.)	COI+16S+ITS2	*		41.23495 23.39382
		7-GR (Milli-GR)	Koursovits_GR (BO)			
APT_Nezica_Kolpa_SLO	Kolpa/GK	/	COI+16S	*	Nežica, SI	45.52916 14.69842
		Nezica_Kolpa_SLO				
		Kolpa				
APT_Osilnica	Kolpa/GK		AY667125		Trontelj in sod., 2005	nad Belico, Osilnica, Kolpa
APT_Osilnica2_SLO	Kolpa/GK	APT_Osilnica	COI+16S+ITS2	*		nad Belico, Osilnica, Kolpa
		Kolpa				
		Osilnica_SLO (Z)				
APT_Petrino_GR	SB	Petrino_GR		*	Petrino, GR	39.49863 22.15774
APT_Raca_SB	SB	Raca_Tara_Mountains_SB	COI+16S+ITS2	*	Rača, Tara mountains SB	44.01652 21.00586
		Raca_Taramountains_SB				
		Alsace_F_2				
APT_Rakitna	CSE	APT_Rakitna	AY667126	Trontelj in sod., 2005	Rakitna, SI	45.89089 14.43965
APT_Rakitna2_SLO	CSE	APT_Rakitna	COI+ITS2	*	Rakitna, SI	45.89089 14.43965
		Rakitna_SLO				
APT_RaulNera_RO	CSE	Riul Tarova Nera_Drainage_RO	COI+16S+ITS2	*	Riul Tarova Nera Drainage, RO	45.03969 22.05380
		CSEEurope_4				
		Riul_Tarova_RO				
APT_RCromojevica	SB	5-CG (id.); APT_RCromojevica(CG	AY677139	Trontelj in sod., 2005	Donje selo, CG	42.54774 19.16645
APT_RCromojevica2(CG	SB	5-CG=APT_Rcromojevica, CG	COI+16S+ITS2	*	Donje selo, CG	42.54774 19.16645
		Dolnjeseo_CromojevicaR(CG				
		Crnojevica(CG				
APT_Ramma_GR	SB	2-GR (id.); APT_Ramma	AY667136	Trontelj in sod., 2005	Ramma, GR	37.50486 21.81236
		Ramma		*	Ramma, GR	37.50486 21.81236

APT_Rouderbaach	CSE	10_APT_Rouderbaach (id.): h65 Rouderbaach		AY667143	Trontelj in sod., 2005	Rouderbaach, LU	49.68289 6.43312	
APT_Rouderbaach2_LU	CSE	10_APT_Rouderbaach, LU (id.)	C01+16S+ITS2			Rouderbaach, LU	49.68289 6.43312	
APT_SERAVA_MK	SB	Serava_MK				Serava, MK	42.01011 21.44067	
APT_TaraR(CG	CSE*	Tara_River_CG	CO1+16S	*		Tara river, CG	42.69750 19.52071	
APT_Velika	CSE?	APT_Velika		AY667131	Trontelj in sod., 2005	Velika, Kirkclarei, TR	41.82262 27.76276	
APT_Velika2_TR	CSE?	Velika_TR	CO1+16S+ITS2	*		Velika, Demirköy, TR	41.82262 27.76276	
		APT_Velika						
		Velika_TR						
APT_Zala	CSE	APT_Zala		AY667123	Trontelj in sod., 2005	Zala Creek, Idrija, SI	45.95752 14.09226	
APT_Zala2_SLO	CSE	APT_Zala	CO1+16S	*		Zala Creek, Idrija, SI	45.95752 14.09226	
		2-SLO						
APT_Zaplana_SLO	CSE	APT_Zaplana		AY667129		Zaplana, Logatec, SI	45.95147 14.20925	
		CSEEUROPE_4						
BANOVINA_1	BAN	BAN_41				Klobučar in sod., 2013	Badnjevice channel, Donji Proložac, HR	43.46570 17.15599
		BANOVINA_1 (h27)		JF293445				
BANOVINA_2	BAN	BAN_92		JF293394		Klobučar in sod., 2013	Maja, Glina, HR	45.32297 16.12940
		BANOVINA_2 (h40)		JN683351				
CSEEurope_1	CSE	CSE_12		JN683357		Klobučar in sod., 2013	Rositsa, Rositsa, BG	43.94517 27.89573
		CSEEUROPE_4 (h4)						
CSEEurope_2	CSE	CSE_2				Klobučar in sod., 2013	Kavuša, Gornji Vakuf, BiH	43.93754 17.58805
		CSEEUROPE_9 (h9)						
CSEEurope_3	CSE	CSE_6				Klobučar in sod., 2013	Lonja, Pako, HR	46.08249 16.28677
		CSEEUROPE_12 (h12)						
GORSKI_KOTAR_1	GK	GORSKI_KOTAR_24				Klobučar in sod., 2013	Blate, Malinci, HR	45.72509 15.34486
		1-SLO (GORSKIKOTAR_1)(h14)		JF293381				
GORSKI_KOTAR_2	Kolpa/GK	GORSKI_KOTAR_26				Klobučar in sod., 2013		
		1-SLO (GORSKIKOTAR_1)(h14)Klobučar 14_26						
GORSKI_KOTAR_3	Kolpa/GK	GORSKI_KOTAR_27				Klobučar in sod., 2013	Gramaljska Dobra, HR	
		GORSKIKOTAR_3 (h16)		JF293383				
LD_1	LD	LD_61				Klobučar in sod., 2013	Kobilica, Palanka, HR	44.13714 16.07475
		LD_1 (h17)						
LD_2	LD	LD_57				Klobučar in sod., 2013	Source Jezero, Sinj, HR	43.70294 16.63753
		LD_1 (h17)		JF293461				
SBALKANS_1	SB	SB_39				Klobučar in sod., 2013	Grošnica, Kragujevac, SB	44.07098 20.97546
		SBALKANS_2 (h20)						
SBALKANS_2	SB	SB_32				Klobučar in sod., 2013	Bošava, Kožuf Mountain, MK	41.25084 22.09244
		SBALKANS_4 (h22)						
SBALKANS_3	SB	SB_1				Klobučar in sod., 2013	Koursovit, Sidirokastro, GR	
		SBALKANS_1 (h13)						
ZELENI_VIR_1	ZV	ZELENI_VIR_52 (h52)				Klobučar in sod., 2013	Zeleni Vir, Radatoviči, HR	45.71265 15.30964
		ZELENIVIR_1 (h36)		JF293402				
ZELENI_VIR_2	ZV	ZELENI_VIR_53 (h53)				Klobučar in sod., 2013	Zeleni Vir, Radatoviči, HR	45.71265 15.30964
		ZELENIVIR_2 (h35)		JF293457				
ZPB_1	ZPB	ZPB_42		JF293403		Klobučar in sod.,	Unnamed stream, Vrelo, HR	45.24816 15.01851
		ZPB_42 (h28)		JF293446				

2013						
ZPB_2	ZPB	ZPB_46	ZPB_1 (h28)	JF293395	Klobučar in sod., 2013	Jarak, Jeleniči, HR
			h46_h29 (COI+16S)	JF293450		
ZPB_3	ZPB	ZPB_48	ZPB_2 (h29)	JF293396	Klobučar in sod., 2013	Sopotski slap, Sošice, HR
			h48_h30 (COI+16S)	JF293452		45.75102 15.38091
Osenovska_BG			ZPB_3 (30)	JF293397		41.96694 23.33121 43.45996 25.73914
Bjala_BG			ITS2	ITS2		

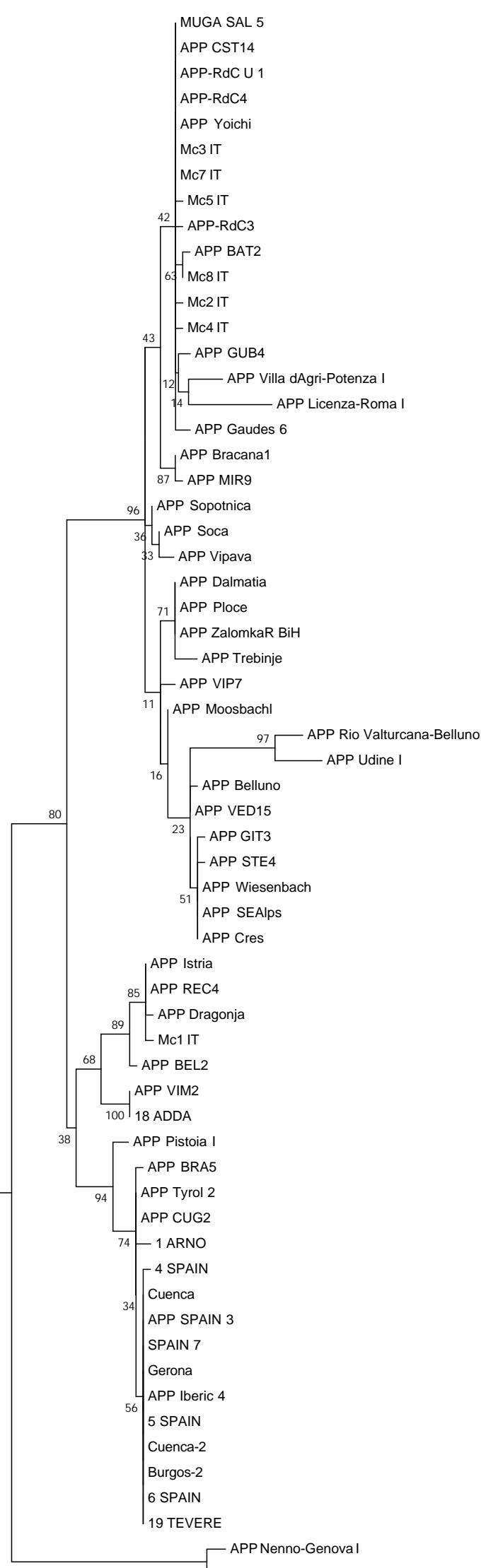
Priloga C: Oznake združenih haplotipov CO1 za metodo MJN analizo za takson *A. pallipes* sensu lato (sekvence CO1 dolžin 399bp).

Wiesenbach:	Wiesenbach, SEAlps, Cres
VIM2:	VIM2, 18ADDA
Tyrol:	Tyrol, CUG2, 2ARNO
Ebro:	Ebro, Valencia, Barcelona, Cuenca, Castellon, Huesca, Gerona, 2Cuenca, Asturias, Burgos, 2Burgos, 2Teruel, Navarra, A.P., Iberic, 10SPAIN, 3SPAIN, 8SPAIN, 11SPAIN, 9SPAIN, 15SPAIN, 14SPAIN, 5SPAIN, 6SPAIN, 12SPAIN, 13SPAIN, 19TEVERE
Gaudes:	Gaudes, 17MUGASAL
RdC7:	RdC7, RdC1, 16MUGASAL, RdC6, RdC5, RdC2, RdC4, CST14, Yoichi, Mc3_IT, Mc6_IT, Mc7_IT
ZalomkaR_BiH:	ZalomkaR_BiH, Dalmatia, Ploce
Istria:	Istria, REC4

Priloga D: Oznake združenih haplotipov CO1 za metodo MJN analizo za takson *A. torrentium*.

ZELENI_VIR_52	ZELENI_VIR_52, ZELENI_VIR_55
CSE_22	CSE_22, CSE_11
Nera_RO	Nera_RO, CSE_23, CernaR_SB
CSE_14	CSE_14, CSE_15
CentrSLO	CentrSLO, Rakitna_SLO
SB_33	SB_33, 9_SB
SB_35	SB_35, Bratesina_SB
Milis1_GR	Milis1_GR, Milis2_GR, Ramma_GR
SB_34	SB_34, SB_37, SB_36

Priloga E: Filogenetsko drevo z metodo ML na osnovi zaporedja CO1 za takson *A. pallipes*.



0.02