

Genska i morfološka raznolikost špiljskog pauka *Stalagtia hercegovinensis*

Pischiutta, Nikola

Master's thesis / Diplomski rad

2025

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:264566>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nikola Pischiutta

**Genska i morfološka raznolikost špiljskog
pauka *Stalagtia hercegovinensis***

Diplomski rad

Zagreb, 2025.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Nikola Pischiutta

**Genetic and morphological diversity of the
cave spider species *Stalagtia hercegovinensis***

Master thesis

Zagreb, 2025.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za nekodirajuće DNA na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Martine Pavlek, zn. suradnice te komentorstvom izv. prof. dr. sc. Tvrtka Dražine. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja sveučilišnog magistra molekularne biologije.

ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Martini Pavlek za mentorstvo, za svu podršku, neizmjereno razumijevanje i korisne savjete koji su mi puno olakšali izradu ovog diplomskog rada.

Hvala svim članovima Hrvatskog biospeleološkog društva na višegodišnjem trudu u sakupljanju špiljskih pauka, bez njih ovo istraživanje ne bi bilo moguće.

Hvala svim kolegama iz BIUSa, pogotovo paučarima i biospelićima, na nezaboravnim iskustvima s terena.

Na kraju, zahvaljujem se svojoj obitelji, Stelli i kolegama s fakulteta na svojoj podršci, društvu i ljubavi. Hvala što ste mi studiranje učinili jednim od najljepših iskustava u životu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Genska i morfološka raznolikost špiljskog pauka

Stalagtia hercegovinensis

Nikola Pischiutta

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Dinarski krš jedna je od svjetskih točaka najveće špiljske bioraznolikosti. Kao i ostali špiljski organizmi, određene skupine pauka također pokazuju karakteristične prilagodbe na život u špiljskim uvjetima kao što su depigmentacija i redukcija očiju. Jedan od takvih pauka je vrsta *Stalagtia hercegovinensis* iz porodice Dysderide, potporodice Harpacteinae. Rasprostranjena je u južnim Dinaridima, od Nacionalnog parka Krka na sjeveru do Crne Gore na jugu. Ovako veliki areal nekarakterističan je za potpuno prilagođenu špiljsku vrstu što podiže sumnje da je *S. hercegovinensis* zapravo kompleks vrsta. Za potvrdu ove hipoteze, izolirana je DNA te su umnoženi i sekvencirani geni *COI*, 16S, 18S, 28S i *H3* od 68 jedinki *S. hercegovinensis* koje su prikupljene u cijelom njezinom arealu. Filogenetske analize i delimitacijske metode potvrdile su postojanje šest podržanih, monofiletskih i geografski razdvojenih skupina. Detaljnim morfološkim analizama jedinki svake skupine utvrđene su razlike u morfologiji spolnih organa, broju i rasporedu četina na segmentima prvog para nogu te stupnju redukcije ostataka očiju. Utvrđeni morfološki karakteri pokazali su se većinom konzistentni za razlikovanje pojedinih skupina. U jednom špiljskom lokalitetu otkrivena je sintopija dvije različite skupine, pojava koja je izuzetno rijetka za špiljske pauke. Ovim istraživanjem stvoreni su temelji za budući opis novih vrsta iz kompleksa *S. hercegovinensis*.

Ključne riječi: špiljski pauci, Dysderidae, Dinarski krš, filogenija, DNA barkodiranje, morfologija

(46 stranica, 18 slika, 4 tablice, 62 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr. sc. Martina Pavlek

Komentor: Izv. prof. dr. sc. Tvrtko Dražina

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Tvrtko Dražina

Izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić

Izv. prof. dr. sc. Anamaria Štambuk

Rad prihvaćen: 6.2.2025.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Genetic and morphological diversity of the cave spider species *Stalagtia hercegovinensis*

Nikola Pischiutta

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Dinaric karst is one of the global centers of underground biodiversity. As well as other underground organisms, certain groups of spiders show characteristic adaptations to underground conditions such as depigmentation and eye reduction. One such species is *Stalagtia hercegovinensis*, from the family Dysderidae, subfamily Harpactinae. It is distributed in the southern Dinarides, from National Park Krka in the north, to Montenegro in the south. Such a large areal is unusual for cave adapted species, and raises a doubt that *S. hercegovinensis* is a species complex. To test that, DNA of 68 specimens of *S. hercegovinensis* was isolated and genes *COI*, *16S*, *18S*, *28S* and *H3* were amplified and sequenced. Phylogenetic analyses and species delimitation methods confirmed the existence of six well supported and geographically separated groups. Morphological analyses revealed discernible differences regarding the morphology of reproductive organs, the number and distribution of spines on anterior legs, and the degree of eye reduction. Observed morphological characters proved consistent in differentiating each group from one another. In one cave locality, a syntopic relationship between two groups was discovered, a most rare occurrence for cave spiders. This research established a foundation for descriptions of new cave spider species in *S. hercegovinensis* complex.

Keywords: cave spiders, Dysderidae, Dinaric karst, phylogeny, DNA barcoding, morphology (46 pages, 18 figures, 4 tables, 62 references, original in: croatian)

This thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Martina Pavlek, PhD

Co-mentor: Assoc. Prof. Tvrtko Dražina, PhD

Reviewers:

Assoc. Prof. Tvrtko Dražina, PhD

Assoc. Prof. Duje Lisičić, PhD

Assoc. Prof. Anamaria Štambuk, PhD

Thesis accepted: February 6th, 2025

SADRŽAJ

KRATICE

1. UVOD.....	1
1.1. Podzemna staništa.....	1
1.2. Raznolikost špiljskih pauka u Hrvatskoj.....	2
1.3. Porodica Dysderidae.....	2
1.4. <i>Stalagtia hercegovinensis</i> , morfologija i problem klasifikacije.....	2
1.5. DNA barkodiranje.....	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	10
3. MATERIJALI I METODE.....	10
3.1. Područje istraživanja.....	10
3.2. Izolacija DNA, umnažanje i sekvenciranje gena.....	11
3.3. Filogenetske analize.....	14
3.4. Morfološke analize.....	15
3.5. Statističke analize.....	18
4. REZULTATI.....	19
4.1. Rezultati filogenetskih analiza.....	19
4.2. Rasprostranjenje genetičkih skupina.....	24
4.3. Rezultati morfoloških analiza.....	26
4.3.1. Morfologija spolnih organa.....	26
4.3.2. Morfologija somatskih značajki.....	30
4.4. Statističke analize.....	32
4.4.1. Selekcija značajnih varijabli.....	32
4.4.2. PCA.....	33
4.4.3. Analiza <i>decision tree</i>	34
5. RASPRAVA.....	35
5.1. Distribucija skupina kompleksa vrste <i>Stalagtia hercegovinensis</i>	35
5.2. Morfološke značajke u usporedbi sa starim radovima.....	36
5.3. Učinkovitost statističkih analiza.....	38
5.4. Utjecaj na konzervaciju.....	38
6. ZAKLJUČAK.....	38
7. LITERATURA.....	39
8. ŽIVOTOPIS.....	
9. PRILOZI.....	I

KRATICE

16S – mitohondrijski gen za malu podjedinicu ribosomske ribonukleinske kiseline

18S – gen za malu podjedinicu ribosomske ribonukleinske kiseline

28S – gen za veliku podjedinicu ribosomske ribonukleinske kiseline

ABGD – *Automatic Barcode Gap Discovery*

ASAP – *Assemble Species by Automatic Partitioning*

BA – *Bayesian analysis*

BiH – Bosna i Hercegovina

bPTP – *Bayesian Poisson Tree Processes*

COI – mitohondrijski gen za podjedinicu I citokrom c oksidaze

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

H3 – gen za histon H3

HBSD – Hrvatsko biospeleološko društvo

ML – *Maximum Likelihood*

pb – parovi baza

PCA – analiza glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PP – *posterior probability*

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

TAE – tris-acetat-etilendiamintetraoctena kiselina

UV – ultraljubičasto

1. UVOD

1.1. Podzemna staništa

Dinarski krš jedna je od svjetskih točaka najveće bioraznolikosti špiljskih organizama (Sket 2012). Na području Dinarida nalazi se minimalno 20 000 poznatih špiljskih i jamskih objekata (Zupan-Hajna 2012). Unutar dinarskih špiljskih sustava pronađeno je skoro 1000 troglobiontnih vrsta, od kojih u prosjeku 40 do 60 % čine endemske vrste ograničene isključivo na područje Dinarida ili uže, nerijetko vezane samo za jedan špiljski objekt (Sket 2012). Neki od poznatih dinarskih špiljskih endema su jedini europski špiljski kralježnjak, čovječja ribica (*Proteus anguinus*), špiljska kongerija (*Congerina spp.*), meštroljeva pijavica (*Croatobranchnus mestrovi*) te Ogulinska špiljska spužvica (*Eunapius subterraneus*), jedna od svega nekoliko špiljskih slatkovodnih spužvi u svijetu.

Krajnji jug Dinarida, odnosno područje granice Hrvatske, Crne Gore i Bosne i Hercegovine, posebno se odlikuje raznolikošću špiljskih organizama. Ova činjenica najbolje se može vidjeti na primjeru špilja Vjetrenice i Bjelušice u Popovom polju koje tvore špiljski kompleks unutar kojeg je nađeno sveukupno 93 obligatnih špiljskih vrsta, od kojih je 48 vodenih, a 45 kopnenih vrsta. Ovako velik broj vrsta u jednoj špilji postavlja Vjetrenicu na drugo mjesto u svijetu prema raznolikosti podzemnih vrsta (Delić i sur. 2023). Pretpostavlja se da je ovako velika raznolikost vrsta na malom području uzrokovana relativno visokom godišnjom stopom padalina, višim temperaturama nego u ostatku regije te blizinom mora, koje je u geološkoj prošlosti bilo izvor organizama koji su mogli kolonizirati podzemne ekosustave (Deharveng i sur. 2024).

Zbog specifičnih okolišnih uvjeta u podzemnim sustavima, kao što su konstantan nedostatak svjetla, male promjene okolišnih uvjeta poput temperature i vlage te slaba dostupnost hrane, organizmi koji cijeli svoj život provode u špiljama razvijaju posebne prilagodbe koje se grupno nazivaju troglomorfije (Christiansen 2012). Neke od najpoznatijih promjena su redukcija očiju (anoftalmija), nedostatak pigmenta, izduživanje tjelesnih nastavaka (udova, osjetilnih organa), usporeni metabolizam i slično (Culver i Pipan 2019). Visoko prilagođene vrste koje više ne mogu preživjeti u vanjskim staništima nazivaju se troglobionti ili obligatni špiljski stanovnici. Oni su ograničeni na podzemna staništa koja najčešće međusobno nisu povezana (npr. podzemna staništa Dinarida i Alpa) te je ta izoliranost razlog visokog stupnja endemizma (Culver i Pipan 2019).

1.2. Raznolikost špiljskih pauka u Hrvatskoj

Kao i ostali troglobiontni organizmi, troglobiontni pauci imaju prilagodbe na špiljske uvjete: redukcija ili potpuni nedostatak očiju, redukcija ili potpuni gubitak kutikularnog pigmenta, stanjenje integumenta, elongacija tjelesnih nastavaka u usporedbi s nadzemnim srodnicima, usporeni metabolizam, promjene cirkadijanog ritma te usporeni razvoj i odrastanje (Mammola i sur. 2018).

Na Dinaridima je opisana prva vrsta špiljskog pauka u svijetu: *Stalita taenaria*, Schiødte 1847. Od tada su na području Dinarida zabilježene 132 vrste špiljskih pauka iz 32 roda i 10 porodica, od čega je 71 vrsta zabilježena u Hrvatskoj (Mammola i sur. 2022). Od 132 vrste, 63 su troglobionti tj. obligatne špiljske vrste, i one sve su endemične za Dinaride, tj. za neko područje unutar Dinarida. Većina špiljskih pauka potječe od vrsta ili grupa koje preferiraju staništa s uvjetima sličnima špiljskim kao što su noćna aktivnost te život u uskim, vlažnim i mračnim prostorima u blizini tla (Arnedo i sur. 2007). Najveći broj špiljskih vrsta pauka u Europi pripada porodicama Dysderidae, Agelenidae, Pholcidae, Nesticidae, Leptonetidae te Linyphiidae (Mammola i sur. 2018).

1.3. Porodica Dysderidae

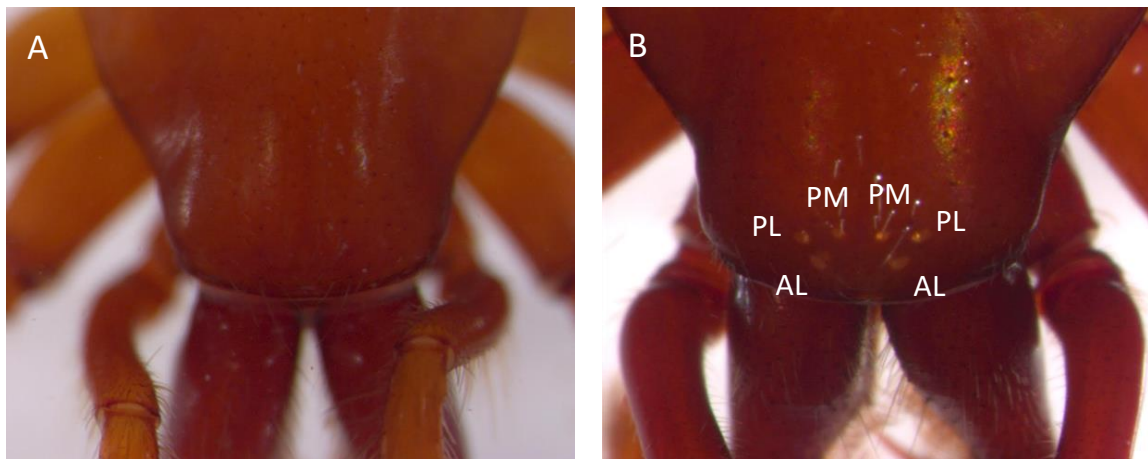
Dysderidae (na hrvatskom šesterookci) su porodica pauka koji se često hrane kopnenim rakovima iz reda Isopoda, točnije porodice Oroniscidae (Pekár i Toft 2015) od kuda dolazi engleski naziv porodice *woodlouse spiders*. Osim kopnenih rakova, hrane se kornjašima, ostalim paucima te ostalim člankonošcima. Posebnom strukturom čeljusti mogu probiti oklop kornjaša i kopnenih rakova s ventralne strane te na taj način usmrtiti svoj plijen (Rezač i sur. 2008). Karakterizira ih tamno crvena boja prednjeg tijela i nogu te blijedožuta do siva boja stražnjeg tijela. Za razliku od mnogih ostalih skupina pauka, pauci ove porodice imaju 6 očiju, najčešće posloženih u dva polukružna reda. Najčešće žive na mračnim i vlažnim staništima, skrivajući se u suhom lišću na tlu, ispod trulog drva ili ispod kamenja. Ovi pauci ne pletu mreže, nego aktivno love svoj plijen na tlu. Ova porodica sastoji se od potporodica Dysderinae, Harpacteinae i Rhodinae, a vrstama najbrojniji rodovi su *Dysdera* i *Harpactea*. Sve tri potporodice sadrže troglobiontne vrste, a postoje i rodovi koji sadrže isključivo troglobiontne vrste kao što su *Stalita*, *Mesostalita*, *Parastalita*, *Stalitella* ili *Minotauria* (Adrián-Serrano i sur. 2024).

1.4. *Stalagtia hercegovinensis*, morfologija i problem klasifikacije

Stalagtia hercegovinensis, Nosek 1905 vrsta je troglobiontnog pauka iz potporodice Harpacteinae, porodice Dysderidae. Rasprostranjena je od Nacionalnog parka Krka na sjeveru

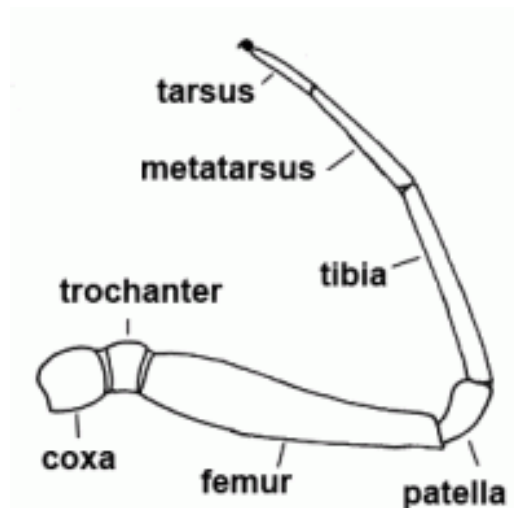
do sjevernog dijela Crne Gore na jugu, na području duljine oko 260 km i površine 13 000 km² (Mammola i sur. 2019). Posjeduje sve karakteristike troglobiontne vrste kao što su redukcija očiju, tijelo bez pigmenta te izdužene tjelesne nastavke u usporedbi s površinskim srodnicima.

Umjesto očiju, kod pojedinih jedinki pojavljuju se bijele mrlje kao svojevrsni ostatak u razvoju oči, no nemaju ulogu funkcionalnih očiju (Slika 1.B), dok je kod pojedinih jedinki prisutan potpuni nedostatak očiju (Slika 1.A). Prema položaju oči se nazivaju anteriorne lateralne (AL), posteriorne lateralne (PL) i posteriorne medijalne (PM) (Slika 1.B).



Slika 1. Ostaci očiju kod vrste *Stalagtia hercegovinensis*. A – glava jedinke bez ostataka očiju. B – glava jedinke s jasno vidljivim i označenim ostacima očiju; AL – anteriorne lateralne oči, PL – posteriorne lateralne oči, PM – posteriorne medijalne oči.

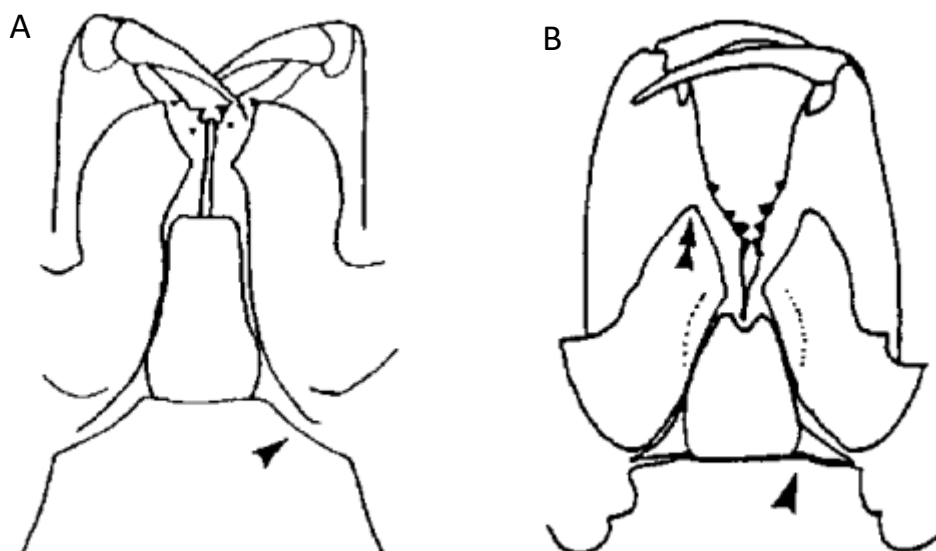
Kao i kod ostalih vrsta pauka, imaju osam nogu od kojih je svaka podijeljena na 7 segmenata: kuk (coxa), prstenak (trochanter), bedro (femur), iverak (patella), goljenica (tibia), baza stopala (metatarsus) i stopalo (tarsus) (Slika 2.).



Slika 2. Označeni segmenti noge pauka, preuzeto sa: Araneae: Spiders of Europe (Nentwig i sur. 2025), <https://araneae.nmbe.ch/glossary>

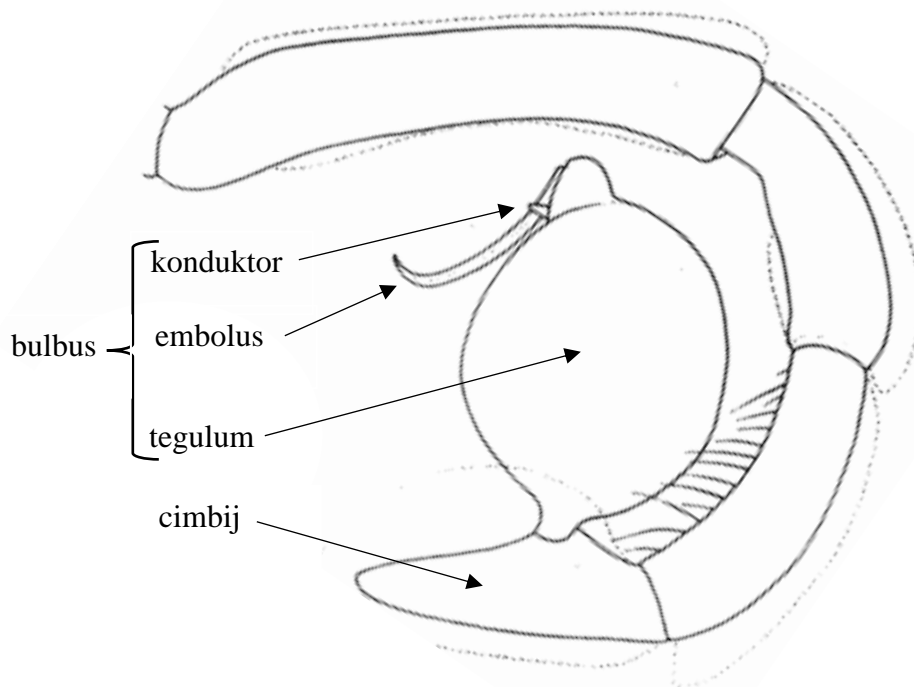
Na vrhu stopala svake noge nalaze se po dvije tarzalne kandžice prekrivene gustim dlačicama. Na nogama imaju brojne sitne osjetilne dlačice (trihobotriji) te dulje i čvršće četine. Na anteriornim tibijama (prva i druga noga) imaju 0-10 četina ventralno, na anteriornim metatarsusima 0-8 četina ventralno, a patelle, coxe i tarsusi svih nogu su isključivo bez četina (Deeleman-Reinhold 1993). Četine na femurima, tibijama i metatarsusima posteriornih nogu (treća i četvrta noga) raspoređene su naizgled nasumično i nalazi ih se prosječno od 15 do 30. Kao i kod drugih pauka, tijelo im je podijeljeno na dva dijela: prednje tijelo (prosoma) i stražnje tijelo (opistosoma). Prednje tijelo i noge ovih pauka narančaste su do crvene boje (Deeleman-Reinhold 1993). Duljina prednjeg tijela veća je od širine prednjeg tijela te omjer duljine i širine iznosi oko 1,3. Ukupna duljina tijela (prednje i stražnje tijelo) je od 6,5 do 12,0 mm, pri čemu je duljina prednjeg tijela do 4,5 mm (Kratochvíl 1970) dok duljina stražnjeg tijela varira te ne ovisi o duljini prednjeg tijela. Usni aparat sličnog je oblika kao kod roda *Harpactea* te se koristi

kao determinacijsko svojstvo za razlikovanje potporodica Harpacteinae (Slika 3.A) i Rhodinae (Slika 3.B).



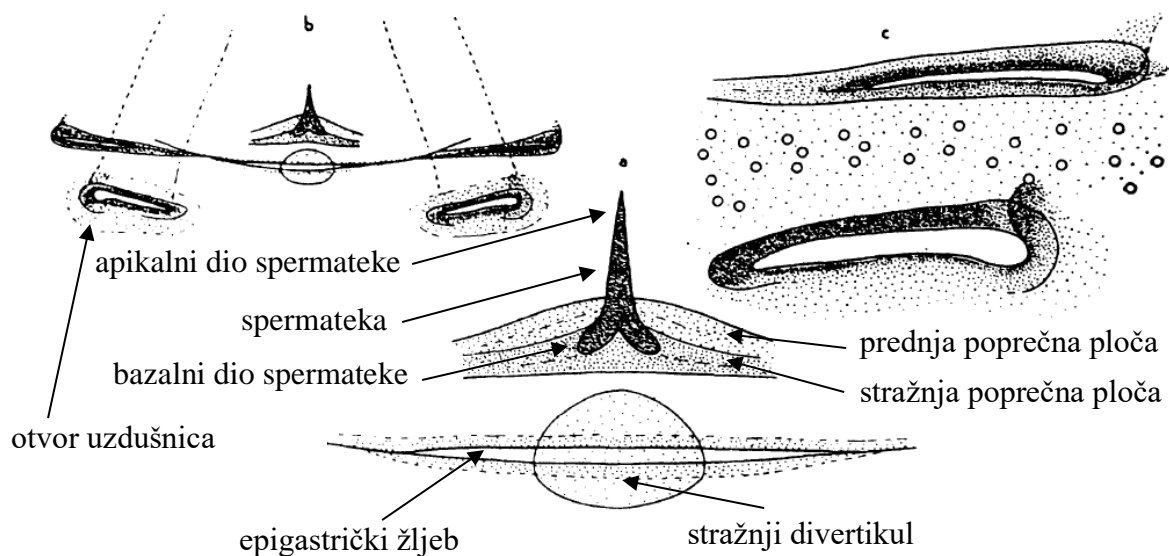
Slika 3. Usni aparat gledan s trbušne strane. A – potporodica Harpacteinae, B – potporodica Rhodinae. Preuzeto iz Heimer i Nentwig 1991.

Na četvrtom kolutiću prednjeg tijela nalaze se čeljusne nožice (pedipalpi) građene od 6 dijelova: kuk (coxa), prstenak (trochanter), bedro (femur), iverak (patella), goljenica (tibia) i stopalo (tarsus) te služe kao osjetilni organ dodira i kao pomoć u pridržavanju plijena. Kod odraslih mužjaka zadnji članak čeljusne nožice preobražen je u spolni organ te je kao takav jedan od glavnih determinacijskih svojstava općenito kod pauka. Preobraženi članak naziva se cimbij (cymbium) te na sebi nosi strukturu zvanu bulbus, koja služi za pohranjivanje i prijenos sperme. Na izbočenom vrhu bulbusa nalaze se embolus, na vrhu kojeg je otvor sjemenovoda, i konduktor (Slika 4.) te se njihov izgled i položaj koristi kao determinacijsko svojstvo. Ostatak bulbusa na kojemu se ne nalaze strukture naziva se tegulum (Slika 4.). Bulbus je simetričan, oblika kugle ili limuna. Embolus je duljine jednake širini bulbusa te zakrivljen pri vrhu, a konduktor je malen te često težak za uočiti (Deeleman-Reinhold 1993).



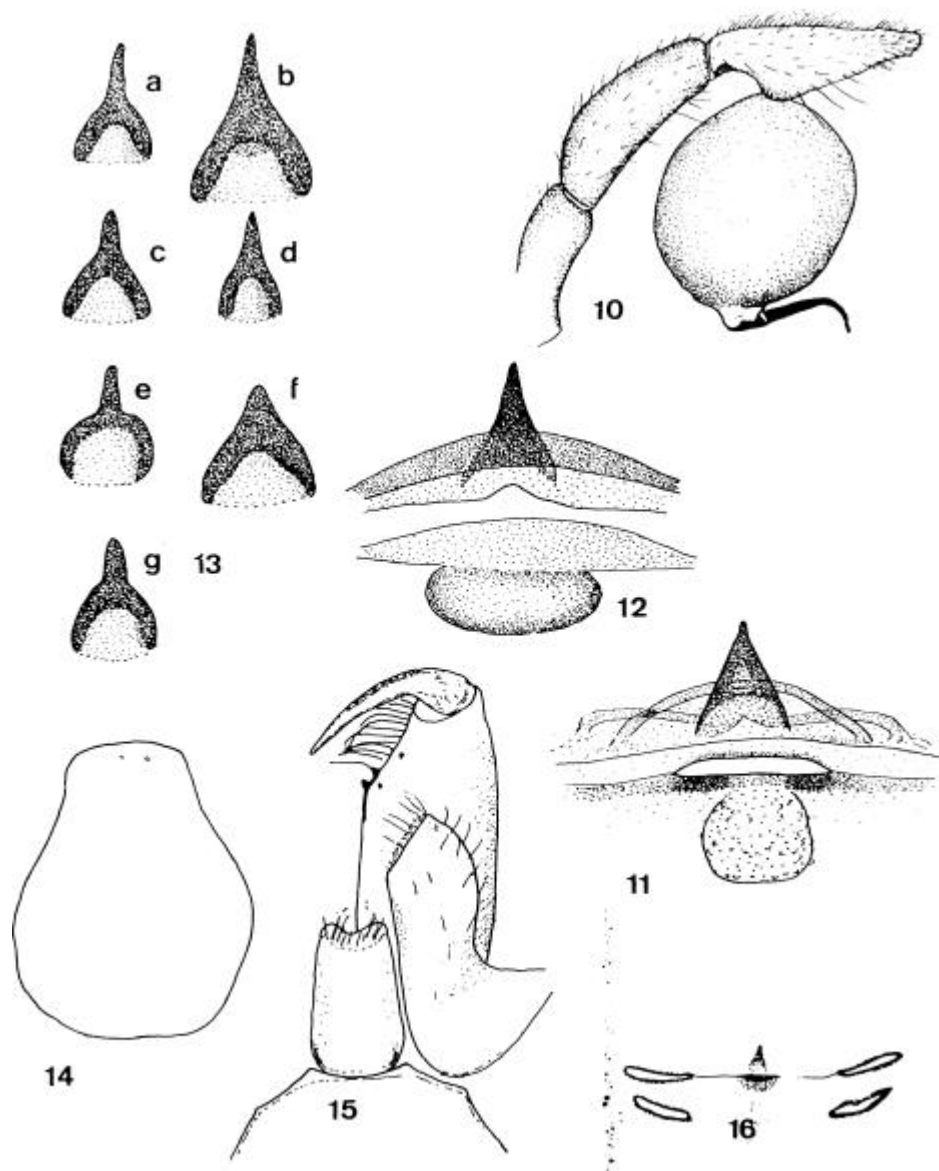
Slika 4. Struktura muškog spolnog organa vrste *S. hercegovinensis* s označenim dijelovima. Preuzeto i prilagođeno prema Kratochvíl 1970.

Ženski spolni organ nalazi se na ventralno-anteriornoj strani stražnjeg tijela, ispred tzv. epigastričkog žlijeba. Za razliku od mnogih drugih skupina pauka, kod kojih je otvor spolnog organa modificiran u sklerotizirani poklopac, odnosno epigin (epigynum), kod porodice Dysderidae to nije slučaj, pa tako ni kod vrste *S. hercegovinensis*. Lateralno, s obje strane spolnog organa, nalaze se sklerotizirani i jasno vidljivi otvori dišnog organa, odnosno lepezastih uzdušnica (Slika 5.). Kada se izdvoji površinski dio stražnjeg tijela koji sadrži spolni otvor i otvore uzdušnica, uočavaju se specifične strukture ženskog spolnog organa. Na samom vrhu nalazi se sklerotizirana spermateka koja služi za pohranu sjemena mužjaka nakon parenja. Ventralno i posteriorno od spermateke prolaze dvije sklerotizirane poprečne ploče, a ispod ili ispred epigastričkog žlijeba nalazi se stražnji divertikul. Spermateka je varijabilne morfologije, oblika obrnutih slova V ili Y, a stražnji divertikul je oblika široke membranozne vrećice (Deeleman-Reinhold 1993).



Slika 5. Unutrašnje strukture ženskog spolnog organa vrste *S. hercegovinensis* s označenim dijelovima. Preuzeto i prilagođeno prema Kratochvíl 1970.

Vrstu *Stalagtia hercegovinensis* opisao je Anton Nosek pod imenom *Stalita hercegovinensis* na temelju ženke iz špilje Vjetrenice u Popovom polju u Bosni i Hercegovini (Nosek 1905). Kasnije, 1970., Joseph Kratochvíl opisuje rod *Stalagtia*, u njega stavlja Nosekovu vrstu *hercegovinensis* (i ranije opisanu vrstu *Stalita monospina* (Absolon i Kratochvíl 1932)) te opisuje nove vrste *Stalagtia purkrabeki* iz Hrvatske (tipski lokalitet špilja Šipun u Cavtatu) te *Stalagtia folki* iz Crne Gore (tipski lokalitet Bobjerska pećina) (Kratochvíl 1970). U svojoj reviziji dinarskih harpacteina iz 1993. Christa Deeleman-Reinhold sinonimizira obje Kratochvílove vrste sa *S. hercegovinensis*. Razlog sinonimizacije je prevelika i nepravilna varijacija morfoloških obilježja, kao što su raspored četina i izgled muških i ženskih spolnih organa (Slika 6.), zbog koje je nemoguće konzistentno razlikovati vrste. Deeleman-Reinhold (1993) navodi da postoji varijacija u obliku bulbusa kod mužjaka, no budući da bulbus ne ulazi u vulvu tijekom kopulacije te činjenice da obrazac varijacije oblika vulve ne odgovara obrascu varijacije oblika bulbusa, oblik bulbusa određen je kao morfološki neinformativan. Dodatni razlog sinonimizacije vrsta bio je nemogućnost proučavanja holotipova svojti *folki* i *purkrabeki* jer su nažalost izgubljeni, vjerojatno u požaru prirodoslovnog muzeja u Brnu za vrijeme drugog svjetskog rata (Růžička i sur. 2005).



Slika 6. Glavna morfološka obilježja vrste *S. hercegovinensis*. Izgled muškog spolnog organa (10), izgled ženskog spolnog organa (11, 12, 16), varijabilnost oblika spermateke (13, a – g) te izgled prednjeg tijela (14) i usnog aparata (15). Preuzeto iz Deeleman-Reinhold (1993).

Iz nedavno objavljene molekularne filogenije porodice Dysderidae, u koju je uključeno nekoliko uzoraka vrste *S. hercegovinensis*, vidi se postojanje 4 nezavisne evolucijske linije u grupi s nominalnim vrstama *S. hercegovinensis* i *S. monospina* (Adrián-Serrano i sur. 2024). Također, neobjavljene analize mentorice Martine Pavlek, u koju je bilo uključeno preko 50 uzoraka vrste *Stalagtia hercegovinensis*, pokazuju potencijalno postojanje 6 nezavisnih linija za koje nisu bile poznate morfološke razlike niti točne granice rasprostranjenja.

1.5. DNA barkodiranje

U zadnjih 20 godina, filogenetske analize pojedinih gena, kao što je DNA barkodiranje (Hebert i sur. 2003a), postale su brze, jednostavne, lako dostupne te, najvažnije, precizne u određivanju i razgraničavanju pojedinih vrsta, a imaju i mogućnost detekcije kriptičnih vrsta (vrste koje su morfološki identične, ali se genetski značajno razlikuju). Budući da vrsta *S. hercegovinensis* ima neobično velik areal te povijest naizgled pogrešnih klasifikacija i revizija vrste zbog vrlo varijabilne morfologije, čini se kao idealan kandidat za filogenetske analize i DNA barkodiranje kojima bi se mogla razjasniti morfološka varijabilnost te bolje taksonomski definirati ovu vrstu.

Kao dodatan alat u taksonomiji, uz morfološku identifikaciju, 2003. godine predloženo je korištenje sekvenci molekule DNA određenih genetskih biljega kao "barkod" regija za određivanje pojedinih vrsta, pri čemu bi svaka vrsta imala svoj "barkod" (Hebert i sur. 2003a). Da ova metoda bude uspješna, bilo je potrebno odabrati adekvatan genetski biljeg, tj. regiju genoma, koja će biti relativno jednostavna za analizu, uključujući laboratorijsku izolaciju gena i bioinformatičku analizu, no, važnije od svega, pomoću koje će biti moguće razlikovati vrste pojedinih organizama. Takav genetski biljeg trebao bi biti dovoljno vrsno specifičan da bude gotovo identičan za jedinke iste vrste, ali različit između jedinki dvije različite vrste te po mogućnosti primjenjiv za razlikovanje što većeg broja organizama. Također, u svrhu jednostavne laboratorijske analize, duljina genetskog biljega trebala bi biti umjerena da umnažanje fragmenta bude što uspješnije, a mjesta za vezanje početnica trebala bi biti konzervirana u većini organizama tako da se mogu koristiti iste robusne početnice za sve organizme. (Fišer Pečnikar i Bužan 2014; Trivedi i sur. 2018)

Genetski biljeg koji ima približno sva navedena svojstva je mitohondrijski gen za podjedinicu I citokrom c oksidaze (*COI*) duljine 658 pb (Hebert i sur. 2003a). Budući da je *COI* mitohondrijski gen, nije podložan rekombinaciji kao jezgreni geni te postoji samo u jednoj kopiji, jer je mitohondrijski genom haploidan, što smanjuje greške kod sekvenciranja uzrokovane heteroplazmijom (dvije različite kopije gena unutar istog diploidnog organizma). Gen *COI* također je manje podložan insercijama i delecijama te nema introne što olakšava bioinformatičke analize (Hebert i sur. 2003b). Gen *COI* već se godinama uspješno koristi za razlikovanje većine skupina životinjskih organizama (Fišer Pečnikar i Bužan 2014).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

S obzirom na navedenu problematiku vrste *S. hercegovinensis*, ovim istraživanjem nastojat će se razriješiti njen status kroz detaljnu filogenetsku i morfološku analizu. U skladu s time, ciljevi ovog istraživanja su:

- Izraditi filogenetsku hipotezu kompleksa vrste *S. hercegovinensis* koristeći standardne gene za rekonstrukciju filogenije pauka
- Razgraničiti potencijalne vrste delimitacijskim metodama uz pomoć gena *COI*
- Napraviti kartu rasprostranjenja potencijalnih novih vrsta
- Odrediti spolna i somatska morfološka obilježja specifična za potencijalne nove vrste
- Na temelju genetičkih, geografskih i morfoloških dokaza definirati potencijalne nove vrste

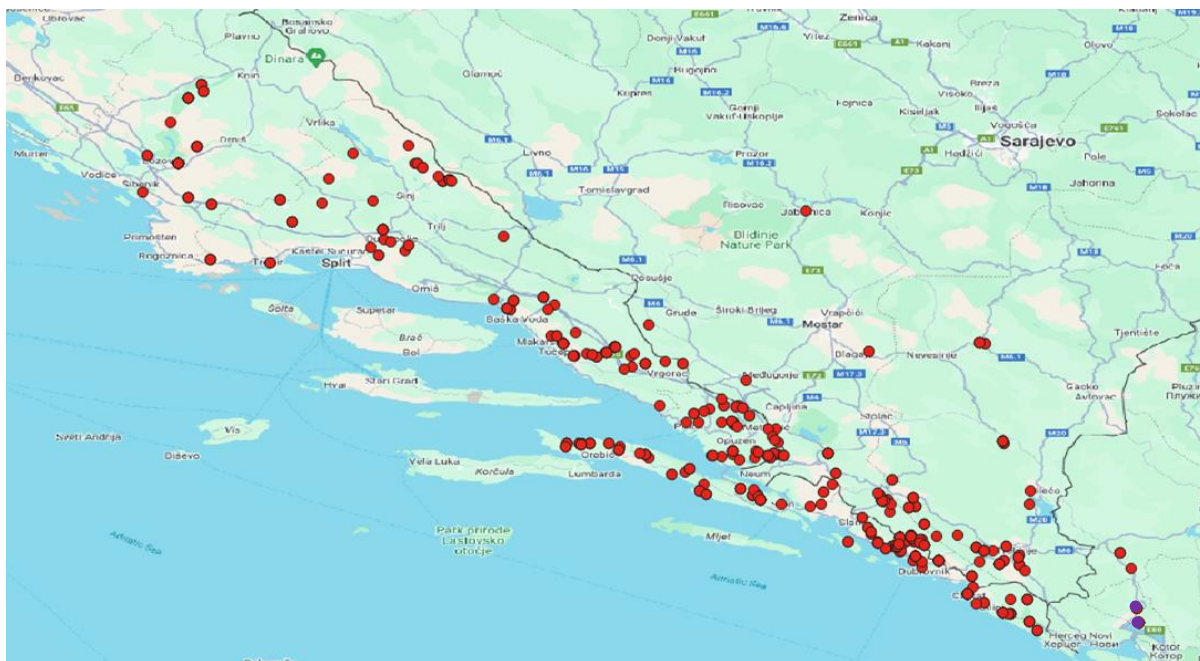
Prema već poznatim podacima o vrsti *S. hercegovinensis* pretpostavlja se da je vrsta *S. hercegovinensis* zapravo kompleks nekoliko vrsta koje se mogu razgraničiti genetski i morfološki.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Područje istraživanja

Materijal pauka vrsta *Stalagtia hercegovinensis* i *Stalagtia monospina* korišten u izradi ovog diplomskog rada dio je zbirke Hrvatskog biospeleološkog društva iz Zagreba (HBSD) te je prikupljen tijekom brojnih istraživanja od 1985. do 2024. godine u 196 špiljska lokaliteta na području središnje i južne Dalmacije, juga Bosne i Hercegovine te na sjeveru Crne Gore (Slika 7.) Pauci su prikupljeni pincetom ili ekshaustorom te potom pohranjeni u 70%-tni ili 96%-tni etanol.

Na temelju podataka iz zbirke HBSD-a i literaturnih nalaza izradio sam kartu rasprostranjenja vrsta *S. hercegovinensis* i *S. monospina* (Slika 7.) u programu QGIS (QGIS 2025., verzija 3.22.5-Białowieża).



Slika 7. Prikaz položaja svih speleoloških objekata u jugoistočnim Dinaridima u kojima su zabilježene jedinke vrste *S. hercegovinensis* (crvene točke) i *S. monospina* (ljubičaste točke). Podaci su iz zbirke HBSD-a (196 nalaza) i literature (dodatnih 47 nalaza).

3.2. Izolacija DNA, umnažanje i sekvenciranje gena

U svrhu provedbe filogenetskih analiza odabrano je 67 jedinki vrste *S. hercegovinensis* na način da se pokrije cijelo njeno rasprostranjenje te tri jedinke vrste *S. monospina*. Genomska DNA izolirana je iz tkiva noge pauka uz pomoć komercijalnih kompleta za izolaciju genomske DNA, specifično DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) i Quick DNA Miniprep (Zymo).

Nakon toga su u lančanoj reakciji polimerazom (skraćeno PCR) i korištenjem specifičnih početnica (Tablica 1.) umnoženi sljedeći geni: *COI* (mitohondrijski gen za podjedinicu I citokrom c oksidaze), *16S*, *28S*, *18S* i *H3* (gen za histon H3). Metoda PCR provedena je u toplokružniku (eng. *thermocycler*) pri uvjetima navedenima u Tablici 2. Uvjeti su bili specifični za svaki gen, a temperatura vezanja početnica je po potrebi snižavana, tj. ako na višoj temperaturi nije umnožen željeni produkt snizili bi je za do 6°C. Ukupni volumen svake reakcije bio je 20 µl.

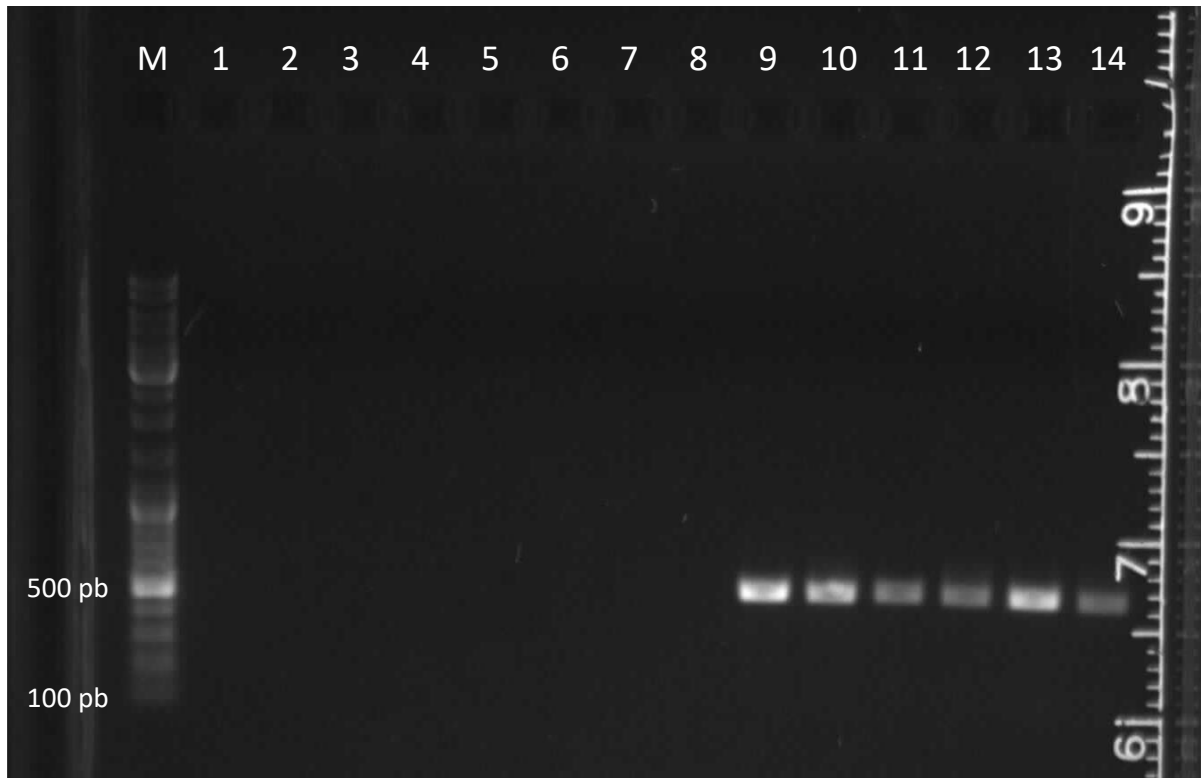
Tablica 1. Popis svih početnica korištenih u reakciji PCR za umnažanje gena *COI*, *H3*, *16S*, *18S* i *28S* te njihove sekvence i izvor.

Gen	Ime početnice	Trivijalno ime	Smjer	Sekvenca 5' - 3'	Literatura
<i>COI</i>	LCO-1490	LCO	uzvodno	GGTCAACAAATCATAAAGATA TTGG	Folmer i sur. 1994
	C1-N-2191	Nancy	nizvodno	CCCGGTAAAATTTAAAATATAA ACTTC	Simon i sur. 1994
	C1-N-2198	HCO	nizvodno	TAAACTTCAGGGTGACCAAAA AATCA	Folmer i sur. 1994
	C1-J-1718	mt6	uzvodno	GGAGGATTTGGAAATTGATTA GTTCC	Simon i sur. 1994
<i>H3</i>	H3aF		uzvodno	ATGGCTCGTACCAAGCAGACV GC	Colgan i sur. 1998
	H3aR		nizvodno	ATATCCTTRGGCATRATRGTGA C	Colgan i sur. 1998
<i>16S</i>	LR-N-13398	16SA	uzvodno	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	Arnedo i sur. 2001
	LR-J-12864	16SB2	nizvodno	CTCCGGTTTGAAGTCAGATCA	Arnedo i sur. 2001
	LR-N-13317	16Sany	uzvodno	TGTGCTAAGGTAGCATAATCA TTTG	Ceccarelli i sur. 2019
<i>18S</i>	5F		uzvodno	GCGAAAGCATTTGCCAAGAA	Giribet i sur. 1996
	9R		nizvodno	GATCCTTCCGCAGGTTACCTA C	Giribet i sur. 1996
<i>28S</i>	28S-O		uzvodno	GAAACTGCTCAAAGGTAAACG G	Hedin i Maddison 2001
	28S-B		nizvodno	TCGGAAGGAACGAGCTAC	Platania i sur. 2020

Tablica 2. Uvjeti temperature i vremena trajanja pojedinih faza u reakciji PCR prema korištenim početnicama za navedene gene.

		<i>COI</i>	<i>16S</i>	<i>18S</i>	<i>28S</i>	<i>H3</i>
		T (°C) / vrijeme	T (°C) / vrijeme	T (°C) / vrijeme	T (°C) / vrijeme	T (°C) / vrijeme
Početna denaturacija		94 / 5 min	94 / 5 min	94 / 5 min	94 / 5 min	94 / 5 min
35 ciklusa	Denaturacija	94 / 30 s	94 / 30 s	94 / 30 s	94 / 30 s	94 / 30 s
	Vežanje početnica	39-45 / 35 s	40-45 / 35 s	55 / 35 s	42-48 / 35 s	45-48 / 35 s
	Produljenje	72 / 45 s	72 / 45 s	72 / 45 s	72 / 60 s	72 / 45 s
Završno produljenje		72 / 5 min	72 / 5 min	72 / 5 min	72 / 10 min	72 / 5 min

Nakon reakcije PCR, provedena je gel elektroforeza u svrhu potvrđivanja uspješnog umnažanja ciljanih gena. Iz svakog uzorka uzet je alikvot dobivenih umnoženih DNA molekula od 5 μ L i analiziran je elektroforezom na 1 %-tnom agaroznom gelu u puferu TAE s dodatkom etidijevog bromida pri naponu od 90 V u trajanju od 30 minuta. PCR produkti su potom vizualizirani pod UV svjetlom pomoću etidijevog bromida koji se veže za molekulu DNA i fluorescira pod UV svjetlom (Slika 8.). Ostatak uspješno umnožene DNA poslan je na obostrano Sangerovo sekvenciranje u institut Macrogen (Nizozemska).



Slika 8. Primjer agaroznog gela pod UV svjetlom nakon elektroforeze. U jažicama 9 -14 pri veličini na oko 600 pb uočava se fluorescencija što potvrđuje uspješno umnažanje gena 16S, dok se u jažicama 1-8 ne uočava fluorescencijski signal što ukazuje na neuspješnu reakciju PCR za uzorke 1-8.

Od 67 uzoraka vrsta *S. hercegovinensis* i *S. monospina* uključenih u DNA analizu, sekvence od 56 uzoraka je prethodno dobiveno u istraživanju mentorice Martine Pavlek, dok sam ja obradio 9 dodatnih uzoraka od identifikacije vrste do umnažanja gena i uređivanja dobivenih sekvenci. Od tih 9 dodatnih uzoraka dio je odabran jer su bili na graničnom području između genetskih skupina, a dio ih pripada genetičkoj skupini sp. 5 za koju je do sada bio umnožen samo gen za *COI* te sam ja umnožio ostale gene (16S, 18S, 28S i *H3*) da bi se mogao testirati njen status zasebne genetske skupine.

3.3. Filogenetske analize

Sekvence sam uređivao u programu Geneious v. 8.1.9 (Kearse i sur. 2012). Sve gene sam sraunio zasebno algoritmom MAFFT v. 7.017 (Katoh i sur. 2002) koristeći standardne postavke te sam ih nakon toga spojio (opcija *concatenate*) u supermatriks sa 332 terminala. Da budem siguran da ću dobiti dobru topologiju stabla, u analizu sam uključio sekvence mnogih vrsta iz porodice Dysderidae (252 uzorka), ali i iz srodnih porodica (13 uzoraka) preuzete iz objavljenih radova (Platania i sur. 2020; Adrián-Serrano i sur. 2024) ili od mentorice Martine Pavlek. Finalni supermatriks, na kojem sam radio *Maximum Likelihood* i *MrBayes* analizu, bio je ukupne duljine 5618 parova baza i sadržavao je sljedeće gene i dužine: *COI* 279 sekvenci (676 pb), 16S 142 sekvence (521 pb), 18S 103 sekvence (1765 pb), 28S 148 sekvenci (2328 pb) i *H3* 180 sekvenci (328 pb).

Maximum Likelihood analizu proveo sam u programu IQ-TREE v. 2.0 (Minh i sur. 2019). Najprije sam upotrijebio algoritam *ModelFinder* (Kalyaanamoorthy i sur. 2017), koji je inkorporiran u IQ-TREE, da odaberem najbolju shemu dijeljenja supermatriksa i odgovarajuće evolucijske modele za svaku particiju u supermatriksu, a zatim sam proveo samu *Maximum Likelihood* analizu s ciljem dobivanja najbolje topologije stabla uz procjenjivanje podrške granama pomoću 1000 ponavljanja *ultrafast bootstrap* metodom u kojoj vrijednosti jednake ili iznad 95 znače da je grana podržana.

MrBayes analizu proveo sam u programu MrBayes v3.2.6 (Ronquist i Huelsenbeck 2003). Najbolju shemu dijeljenja supermatriksa i odgovarajuće evolucijske modele za svaku particiju procijenio sam uz pomoć programa Partition Finder v2.1.1 (Lanfear i sur. 2017). MrBayes analiza je provedena za 18 milijuna generacija, uzorkovanjem svake 1000-ite, s osam simultanih Markov Monte Carlo lanaca (MCMC) temperaturom zagrijavanja (*temp*) od 0,15 i relativnim početnim izgaranjem (*burn-in*) od 25%. Vrijednosti podrške izračunate su kao posteriorne vjerojatnosti (*posterior probabilities*), što znači da su grane s vrijednosti jednake ili iznad 75 podržane. Konvergencija lanaca, ispravno miješanje i broj odbačenih (*burn-in*) generacija praćeni su programom Tracer v. 1.7 (Rambaut i sur. 2018). *MrBayes* analizu proveo sam na internetskom portalu CIPRES Science Gateway (Miller i sur. 2010). Filogenetska stabla sam estetski uredio pomoću programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) i pomoću internetskog alata iTOL (Letunic i Bork 2021).

Za određivanje potencijalnih novih vrsta (eng. *putative species*) unutar kompleksa vrste *S. hercegovinensis* koristio sam sljedeće metode za razgraničavanje vrsta (eng. *species*

delimitation methods): ASAP (Puillandre i sur. 2020), ABGD (Puillandre i sur. 2012) i bPTP (Zhang i sur. 2013), uz evolucijske statističke modele *Kimura (K80)*, *Simple Distance (p-distance)* i *Bayesian analysis (BA)*. Sve tri metode za razgraničavanje vrsta provedene su sa 68 sekvenci gena *COI* duljine 658 pb. Metode ABGD i ASAP bazirane su na genetskim udaljenostima između sekvenci te daju opcije za podjelu originalne skupine sekvenci u zasebne grupe prema statističkoj vjerojatnosti da je pojedina grupa zaista nova vrsta, odnosno prema otkrivanju takozvanog „barcode gap“ koji predstavlja nedostatak preklapanja u distribucijama unutarvrstnih i međuvrstnih genskih udaljenosti (Puillandre i sur. 2012; Puillandre i sur. 2020; Hubert i sur. 2024). Metoda ASAP naprednija je implementacija metode ABGD te svakoj podjeli dodjeljuje vrijednost „*asap-score*“ kao procjenu vjerojatnosti podjele. Najvjerojatnija podjela ima najnižu vrijednost „*asap-score*“ (Puillandre i sur. 2020). Metoda bPTP bazira se na razlikovanju mutacijskog obrasca unutar i među vrstama (*speciations* ili *branching events*) na već postojećem ukorijenjenom filogenetskom stablu korištenjem više kombiniranih evolucijskih modela te *Maximum likelihood* i *Bayesian* algoritama za odabiranje statistički najznačajnije podjele (Zhang i sur. 2013; Hubert i sur. 2024).

Za metodu ASAP koristio sam modele *Kimura (K80)* i *Simple Distance (p-distance)*, a za metodu ABGD model *Kimura (K80)* uz modificiranu postavku *X (relative gap width) = 1.0*. Za metodu bPTP najprije je bilo potrebno napraviti ML stablo sa svih 68 sekvenci gena *COI*, što sam napravio u programu IQ-TREE v. 2.0. S takvim ML filogenetskim stablom proveo sam analizu metodom bPTP uz zadane postavke.

U svrhu vizualizacije unutarvrstnih odnosa napravljena je filogenetska TCS mreža (Clement i sur. 2002) metodom statističke parsimonije (eng. *statistical parsimony*). Filogenetska TCS mreža napravljena je u programu PopART (Leigh i Bryant 2015) koristeći set podataka od 60 sekvenci gena *COI* duljine 387 pb. Sve sekvence su skraćene te je sačuvan najinformativniji središnji dio sekvenci gena *COI* od 387 pb zbog konstantnog rušenja programa PopART pri radu sa sekvencama veće duljine te većim brojem sekvenci. Izbačene su sekvence koje nisu imale potpune krajeve nakon rezanja sekvenci na duljinu 387 pb.

3.4. Morfološke analize

Na temelju *Maximum likelihood*, *MrBayes* i analiza razgraničavanja vrsta koristeći genetske podatke te na temelju prostornog rasprostranjenja genetičkih skupina, odredio sam skupine (potencijalne vrste) unutar kompleksa vrste *S. hercegovinensis* za koje sam onda napravio detaljnu morfološku analizu s ciljem pronalaženja morfoloških karaktera za njihovo

odjeljivanje. Morfološke analize radio sam pod binokularnom lupom Zeiss Stereo Discovery V20 na kojoj montirana digitalna kamera Zeiss Axiocam 105 color. Od morfoloških značajki gledao sam oblik muških i ženskih spolnih organa, prisutnost i raspored ostataka očiju, broj i raspored četina na svakoj nozi te vrijednosti linearnih mjerenja koja su uključivala: duljinu i širinu prednjeg tijela pauka, širinu glavenog područja i duljinu i širinu goljenice prve i četvrte noge. Jedinke koje sam izabrao za morfološke analize bile su odrasle jedinke s jasno definiranim i razvijenim četinama i spolnim organima. Broj analiziranih jedinki po skupini prikazan je u Tablici 3. Broj analiziranih jedinki nejednolik je zbog nedostatka odraslih jedinki pojedinih skupina, prvenstveno mužjaka.

Tablica 3. Broj jedinki svakog spola izabran za morfološke analize prema skupini; opisi i crteži mužjaka skupine sp. 3 uzeti su iz literature (Kratochvíl 1970).

Skupina	Broj mužjaka	Broj ženki
sp. 1	4	4
sp. 2	3	6
sp. 3	0	2
sp. 4	4	6
sp. 5	6	6
<i>S. hercegovinensis</i>	5	6
<i>S. monospina</i>	1	1

Za analizu spolnih organa, mužjacima sam odvojio desnu čeljusnu nožicu, s nje sam odvojio bulbus te ga fotografirao s dorzalne i lateralne strane pod lupom na povećanju 55X. Ženkama sam izolirao vulvu te sam je stavio na nekoliko sekundi u 20% -tnu vodenu otopinu kalijeve lužine radi otapanja i lakšeg uklanjanja okolnog nesklerotiziranog tkiva. Tako pripremljene vulve fotografirao sam s ventralne i dorzalne strane pod povećanjima od 55X i 112X. Pomoću programa ZEN (verzija 3.1. blue edition) proveo sam linearna mjerenja na fotografijama.

Izmjerene vrijednosti somatskih značajki (Tablica 4.) koristio sam za statističke analize u programu RStudio (verzija 2024.4.2.764, Posit team 2024) u svrhu pronalaska statistički značajnih razlika među pojedinim skupinama, statistički značajnih varijabli za razlikovanje skupina i vizualizaciju grupiranja skupina prema somatskim značajkama.

Tablica 4. Popis i objašnjenje svih mjerenih somatskih značajki; broj četina računat je kao prosjek broja četina na paru nogu.

Varijabla	Objašnjenje
F1_dorzalno	Broj četina na dorzalnoj strani femura prve noge
F1_prolatdorz	Broj četina na prolateralno - dorzalnoj strani femura prve noge
F1_prolateralno	Broj četina na prolateralnoj strani femura prve noge
F1_retrolatdorz	Broj četina na retrolateralno - dorzalnoj strani femura prve noge
F1_retrolateralno	Broj četina na retrolateralnoj strani femura prve noge
F1_ventralno	Broj četina na ventralnoj strani femura prve noge
F1_prolatven	Broj četina na prolateralno - ventralnoj strani femura prve noge
F1_retrolatven	Broj četina na retrolateralno - ventralnoj strani femura prve noge
T1_ventralno	Broj četina na ventralnoj strani tibije prve noge
MT1_ventralno	Broj četina na ventralnoj strani metatarsusa prve noge
F2_dorzalno	Broj četina na dorzalnoj strani femura druge noge
F2_prolatdorz	Broj četina na prolateralno - dorzalnoj strani femura druge noge
F2_prolateralno	Broj četina na prolateralnoj strani femura druge noge
F2_retrolatdorz	Broj četina na retrolateralno - dorzalnoj strani femura druge noge
F2_retrolateralno	Broj četina na retrolateralnoj strani femura druge noge
F2_ventralno	Broj četina na ventralnoj strani femura druge noge
F2_prolatven	Broj četina na prolateralno - ventralnoj strani femura druge noge
F2_retrolatven	Broj četina na retrolateralno - ventralnoj strani femura druge noge
T2_ventralno	Broj četina na ventralnoj strani tibije druge noge
MT2_ventralno	Broj četina na ventralnoj strani metatarsusa druge noge
F3_random	Broj četina na femuru treće noge
T3_random	Broj četina na tibiji treće noge
MT3_random	Broj četina na metatarsusu treće noge
F4_random	Broj četina na femuru četvrte noge
T4_random	Broj četina na tibiji četvrte noge
MT4_random	Broj četina na metatarsusu četvrte noge
pl	Duljina prednjeg dijela tijela (prosome)
pw	Širina prednjeg dijela tijela (prosome)
ph	Visina prednjeg dijela tijela (prosome)
hw	Širina glavenog dijela
t1l_L	Duljina tibije prve lijeve noge
t1w_L	Širina tibije prve lijeve noge

Tablica T4. Nastavak.

t4l_L	Duljina tibije četvrte lijeve noge
t4w_L	Širina tibije prve četvrte noge
pl_adj	Prilagođena duljina prednjeg dijela tijela (prosome)
pw_adj	Prilagođena širina prednjeg dijela tijela (prosome)
ph_adj	Prilagođena visina prednjeg dijela tijela (prosome)
hw_adj	Prilagođena širina glavenog dijela
t1l_L_adj	Prilagođena duljina tibije prve lijeve noge
t1w_L_adj	Prilagođena širina tibije prve lijeve noge
t4l_L_adj	Prilagođena duljina tibije četvrte lijeve noge
t4w_L_adj	Prilagođena širina tibije prve četvrte noge

Mjerljive somatske značajke uvrštene su u tablicu na način da svaki stupac predstavlja morfološku značajku (npr. F1_retrolateralno za broj četina na retrolateralnoj strani femura prve noge, širina i duljina prednjeg tijela, duljina tibije prve i četvrte noge, itd.), a svaki red analiziranu jedinku. Segment noge i položaj na kojem se nalaze četine uvršteni su u zasebne stupce za prve dvije noge te su zadržani stupci samo za položaje na kojima se kod svih skupina konzistentno pojavljuju četine. Linearna mjerenja također su uvrštena u analizu i to nemodificirana, "sirova" mjerenja te mjerenja normalizirana s obzirom na širinu prednjeg tijela (svaka varijabla podijeljena je s vrijednosti širine prednjeg tijela za pojedinu jedinku) koja služi kao procjenitelj općenite veličine tijela pauka (Moya-Laraño i sur. 2008).

3.5. Statističke analize

U svrhu vizualizacije različitih skupina prema morfološkim značajkama koristio sam metodu PCA (engl. *principal component analysis*) za redukciju dimenzionalnosti podataka na dvije glavne komponente. PCA je metoda nenadziranog strojnog učenja što znači da, bez znanja o prethodnoj klasifikaciji pojedinih skupina, može grupirati podatke prema zadanim varijablama. Ovom metodom dobiva se uvid u računalni način grupiranja skupina prema zadanim morfološkim značajkama čime se podaci objedinjuju i postiže se jednostavnija interpretacija morfoloških podataka. Može se uočiti i koje skupine se bolje odvajaju od drugih, što ukazuje na potencijalnu problematiku kod determinacije skupina koje su blisko grupirane.

Za razliku od metode PCA, za obradu navedenih morfoloških podataka koristio sam i algoritme nadziranog strojnog učenja kao što su *decision tree* i *Boruta* (Kursa i sur. 2010). Ove metode

imaju informaciju o prethodnoj klasifikaciji (koje značajke pripadaju jedinki koje skupine) te na temelju toga računaju statistički bitne značajke za odvajanje i razlikovanje skupina. Za pronalaženje statistički najinformativnijih morfoloških značajki koristio sam algoritam *Boruta*. Ova metoda pomoću algoritma nasumične šume (engl. *random forest*) računa koje varijable najviše pridonose klasifikaciji u skupine, odnosno prepoznaje varijable unutar kojih postoji dovoljno značajnih razlika među skupinama da bi se mogle smatrati važnima za daljnje analize te pomaže u odabiru bitnih varijabli za daljnje statističke analize, ali i za odabir potencijalno bitnih značajki u morfološkoj identifikaciji. Naposljetku, algoritam *decision tree* sam koristio u svrhu vizualizacije računalnog procesa klasifikacije te stvaranje svojevrsnog determinacijskog ključa za razlikovanje pojedinih skupina. Ova metoda ne daje definitivan i točan determinacijski ključ, ali uvelike pomaže u identifikaciji značajki važnih za odvajanje skupina.

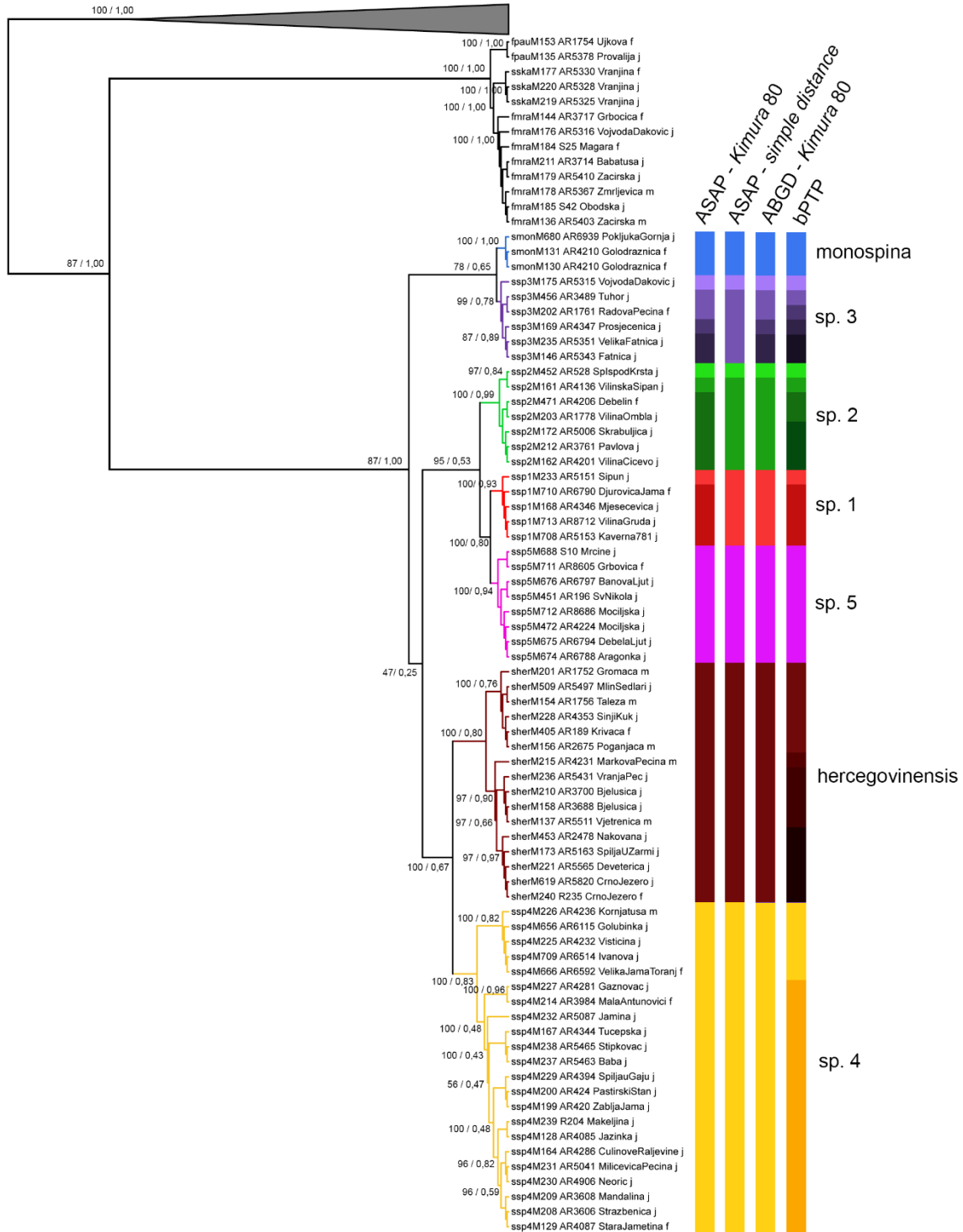
Najprije sam napravio selekciju značajnih varijabli pomoću algoritma Boruta koristeći zadane postavke funkcije *Boruta* iz paketa *Boruta* (Kursa i sur. 2010) u programu R. Nakon selekcije varijabli s odabranim varijablama napravio sam analize PCA i *decision tree*. Za metodu PCA koristio sam funkciju *prcomp* nad odabranim varijablama uz opciju *scale=TRUE* te za vizualizaciju rezultata, funkciju *ggord* iz paketa *ggord* (Beck 2024). *Decision tree* napravio sam pomoću funkcije *rpart* iz paketa *rpart* (Therneau i sur. 2015) uz parametre: *method = "class"*, *control=rpart.control(minsplit=1, minbucket=1, cp=0.001)*, a vizualizirao sam ga pomoću funkcije *rpart.plot* iz paketa *rpart.plot* (Milborrow 2019).

4. REZULTATI

4.1. Rezultati filogenetskih analiza

Rezultat *Maximum likelihood* analize prikazan je na Slici 9. Kompleks vrste *S. hercegovinensis* podijeljen je u šest genetičkih skupina, dok je vrsta *S. monospina* podržana kao zasebna vrsta. Svaka genetička skupina obojana je drugom bojom. Iako grupa vrsta sačinjena od vrste *S. monospina* i kompleksa vrste *S. hercegovinensis*, koju sam nazvao *Stalagtia sensu stricto*, nije podržana, vrijednost je ipak dosta visoka (*ultrafast bootstrap* 87), a somatska morfologija i morfologija spolnih organa (Deeleman-Reinhold 1993) neupitno podržava njenu odvojenost od grupe *Folkia pauciaculeata* – *F. mrazeki* – *Stalagtia skadarensis*. Unutar grupe *Stalagtia sensu stricto* vrsta *S. monospina* i genetička skupina sp. 3 čine grupu koja je sestrinska većoj grupi koju čine sve druge genetske skupine. Unutar te veće grupe vidi se podjela na dvije grupe: jednu čine genetske skupine sp. 1, sp. 2 i sp. 5, a drugu sp. 4 i nominalna *S. hercegovinensis*.

MrBayes analiza dala je identičnu topologiju stabla kao *Maximum likelihood* (Slika P1.), s tim da je ovdje *Stalagtia sensu stricto* grupa maksimalno podržana (PP = 1.00). Podjela unutar *Stalagtia sensu stricto* grupe je ista: *S. monospina* i sp. 3 čine sestrinsku grupu ostatku skupina, s tim da genetske skupine sp. 1, sp. 2 i sp. 5 čine jednu, a sp. 4 i nominalna *hercegovinensis* drugu grupu. Pošto je topologija *MrBayes* stabla ista kao u ML analizi, taj rezultat sam prikazao u obliku posteriornih vjerojatnosti označenih na ML stablu uz *ultrafast bootstrap* vrijednosti (Slika 9).

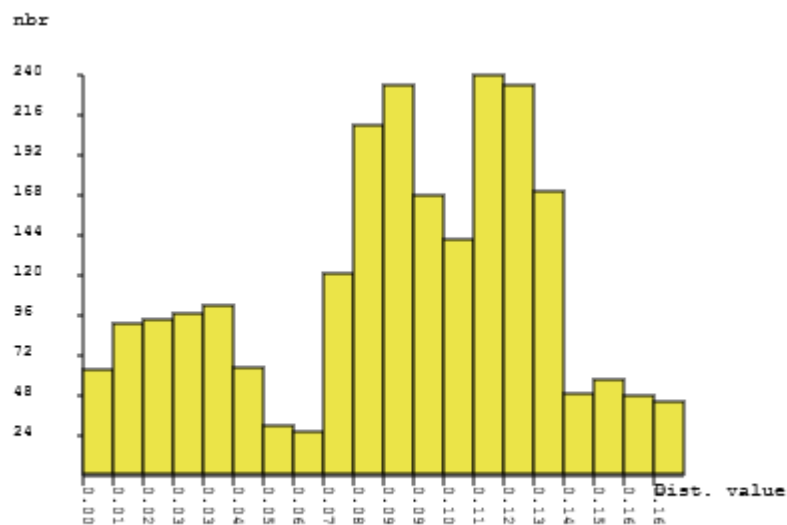


Slika 9. *Maximum likelihood* filogenetsko stablo dobiveno iz supermatriksa od 5 gena. Brojevi iznad grana označavaju njihovu podržanost: prvi broj označava *ultrafast bootstrap* vrijednost iz ML analize gdje 95 ili više znači da je grana podržana, dok drugi broj označava posteriornu vjerojatnost iz *MrBayes* analize gdje vrijednost 0,75 ili više označava podržanost grane. Sivo obojeni trokut označava sve vanjske grupe, skupno prikazane. Desno od stabla prikazani su rezultati delimitacijskih metoda ASAP (modeli *Kimura 80* i *Simple Distance*), ABGD (model *Kimura 80*) i bPTP redom.

Sve delimitacijske metode su preferencijalno, tj. s većom potporom, razdvojile kompleks vrste *S. hercegovinensis* na više grupa nego što su to prepoznale filogenetske metode (*Maximum likelihood* i *MrBayes*).

Metoda ASAP uz model *Kimura 80* kao najbolju podjelu daje podjelu na 37 grupa (*asap score* = 4,0), a uz model *simple distance* kao najbolju podjelu daje 53 grupe (*asap score* = 5,5). Najkonzervativnija podjela uz model *Kimura 80* (rangirana na zadnjem, 8. mjestu, *asap score* = 8,5), tj. ona koja prepoznaje najmanje grupa, svrstava sve jedinke iz skupina *hercegovinensis*, sp. 4 i sp. 5 u zasebne grupe, dok ostale razdvaja na podgrupe koje odgovaraju prostornom rasporedu i topologiji na filogenetskim stablima (Slika 9). Šesta (*asap score* = 9,5) po redu rangiranja podjela grupa prema modelu *simple distance* najbolje odgovara genetskim grupama iz filogenetske analize: sve jedinke iz skupina *hercegovinensis*, sp. 4, sp. 5 i sp. 1 svrstava u zasebne grupe, dok skupine sp. 3 i sp. 2 dijeli na podgrupe koje odgovaraju prostornom rasporedu i topologiji na filogenetskim stablima. Rezultati ASAP analize prikazani su na Slikama P2 i P3 u prilogu.

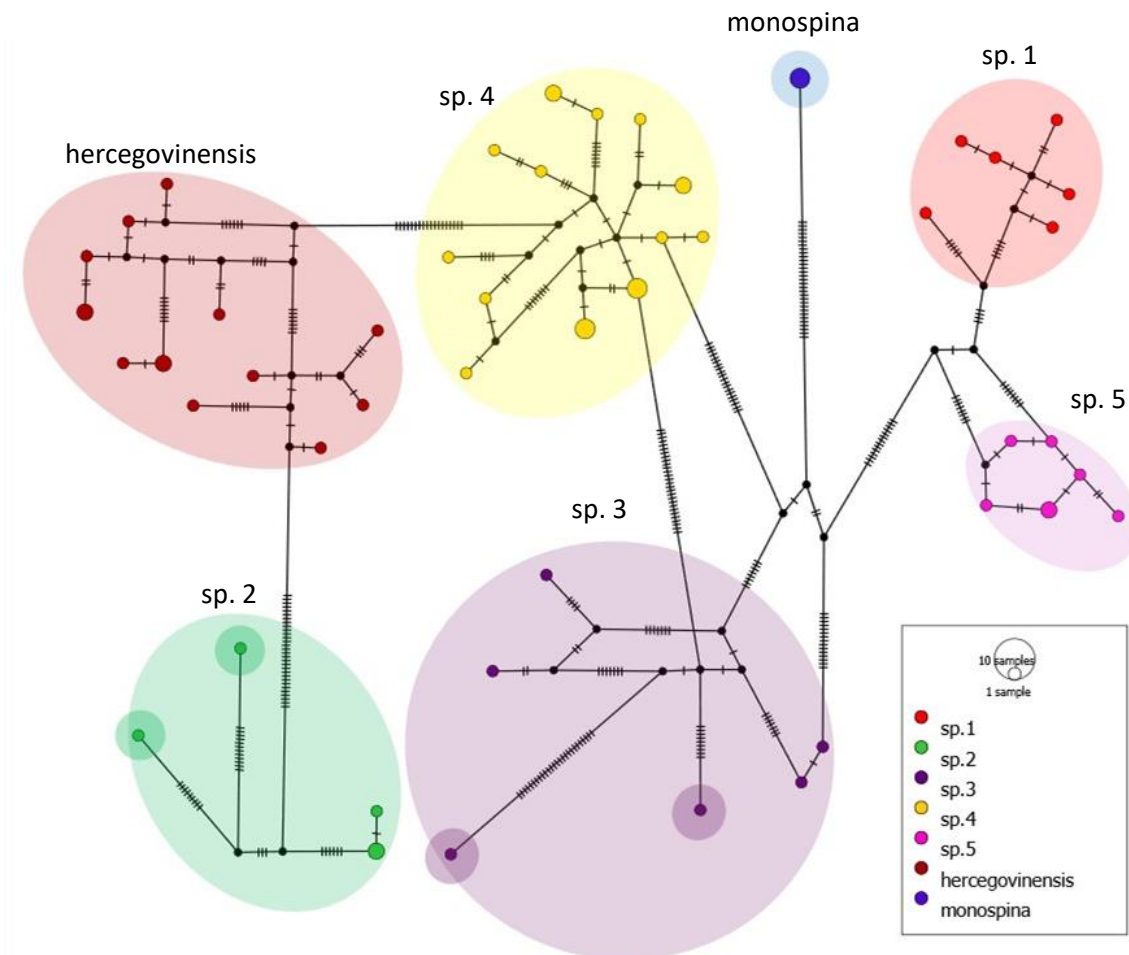
Metodom ABGD nije otkriveno potpuno razdvajanje genskih udaljenosti u sekvenci gena *COI*, tj. vidi se preklapanje u distribucijama unutarvrskih i međuvrskih genetskih udaljenosti u vrijednostima od 0.05 do 0.07 (Slika 10.). Što se tiče podjele na grupe (Tablica P1.), sve grupe odgovaraju genetskim skupinama u filogenetskom stablu, osim što su skupine sp. 2 i sp. 3 razdvojene na 2, odnosno 4 grupe što odgovara ASAP *simple distance* podjeli.



Slika 10. Histogram raspodjele genetskih udaljenosti u COI sekvenci dobiven metodom ABGD.

Metoda bPTP daje informaciju da je optimalan broj grupa između 11 i 35 te kao najbolju podjelu daje podjelu na 20 grupa prikazanu na Slici 9. Kao i ostale metode, sve grupe odgovaraju skupinama na filogenetskom stablu, osim što većinu skupina dijeli na podgrupe koje odgovaraju topologiji stabla. Jedino skupina sp. 5 nije podijeljena na podgrupe. Rezultat bPTP analize prikazan je na Slici P4.

Filogenetska TCS mreža izrađena pomoću programa PopART (Leigh i Bryant 2015) prikazana je na Slici 11. Na mreži su sve genetičke skupine identificirane filogenetskim analizama (Slika 9.) dobro odvojene s većim brojem mutacijskih koraka. Između skupina sp. 1 i sp. 5 postoji manja odvojenost, odnosno manji broj mutacija (minimalno 17) nego između ostalih skupina (minimalno 28). Unutar skupina sp. 3 i sp. 2 postoje pojedine jedinice koje se izdvajaju od ostatka skupine sa značajnim brojem mutacijskih koraka, ukazujući na jaku genetičku strukturu (što se vidi i iz delimitacijskih analiza). Filogenetska mreža također pokazuje i da se sa setom podataka skraćenih sekvenci gena COI (387 pb) može dobiti relativno velika razlučivost odvajanja skupina.

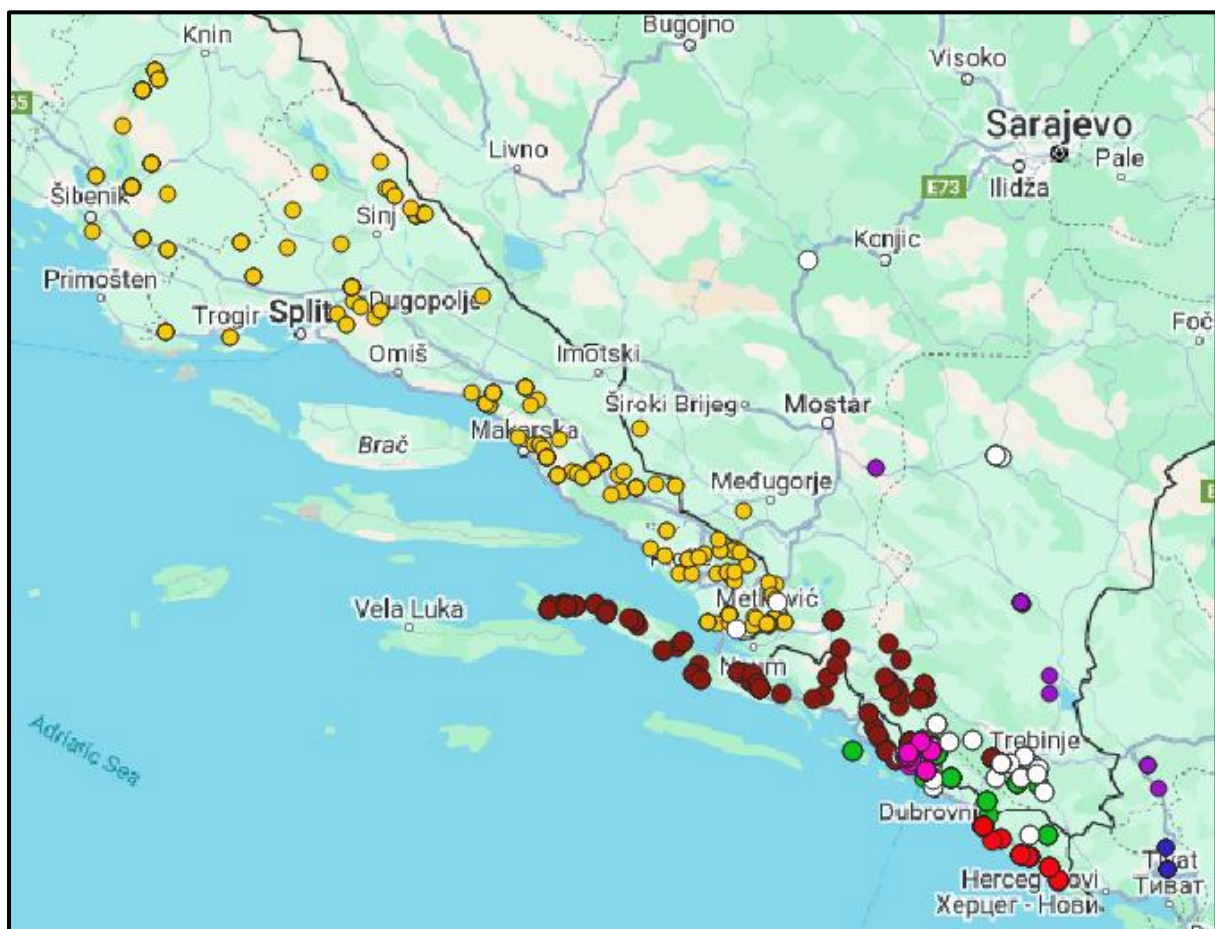


Slika 11. Filogenetska TCS mreža izrađena pomoću programa PopART (Leigh i Bryant 2015). Veličina obojenih točaka u TCS mreži odgovara učestalosti pojedine sekvence, crne točke predstavljaju potencijalne uzorke koji nedostaju (neuzorkovane ili izumrle jedinke), dok okomite crtice označavaju broj mutacijskih koraka. Boja grupa odgovara boji genetičkih skupina u filogenetskom stablu na Slici 9.

4.2. Rasprostranjenje genetičkih skupina

U svrhu vizualizacije prostornog rasporeda pojedinih skupina, napravio sam kartu rasprostranjenosti prikazanu na Slikama 12 i 13. Na karti se jasno vidi geografska odijeljenost pojedinih genetičkih skupina dobivenih *Maximum likelihood* i *MrBayes* analizama te delimitacijom vrsta (Slika 9). Skupina sp. 1 (crveno) smještena je na krajnjem jugu Hrvatske na području Konavala. Skupina sp. 2 (zeleno) smještena je sjeverozapadno od sp. 1 i proteže se od planine Sniježnice iznad Konavala, preko područja južno i zapadno od Trebinja u Bosni i Hercegovini i okolice Dubrovnika (uključujući sjevernu stranu zaljeva Rijeka Dubrovačka), pa sve do otoka Šipana. Nominalna skupina *S. hercegovinensis* proteže se od područja nekoliko kilometara sjeverno od skupine sp. 2 na sjever do granice s BiH kod Neuma; od tamo na zapad preko cijelog Pelješca, a na istok do istočnog ruba Popovog polja u BiH. Od tamo se spušta na jug sve do sela Taleža, oko 10 kilometara zapadno od Trebinja. Brdovito područje oko granice

između Hrvatske i BiH koje se prostire između Popovog polja u BiH i Jadranske obale naziva se Grepci i na tom području skupine sp. 2 i nominalna *S. hercegovinensis* dolaze jako blizu jedna drugoj. Međutim, među njih smjestila se je i skupina sp. 5 (ružičasto), poznata iz 10 speleoloških objekata na površini od svega 30 kvadratnih kilometara (Slika 13.). Iznenađujuće, skupine *hercegovinensis* i sp. 5 se pojavljuju u istoj špilji, Špilji za Gromačkom vlakom. Skupina sp. 3 (ljubičasto) smještena je više u unutrašnjosti, isključivo u južnoj Bosni i Hercegovini te u Crnoj Gori, a skupina sp. 4 (žuto) rasprostranjena je od granice Hrvatske i BiH kod Neuma, pa na sjever sve do kanjona rijeke Krke. Na karti je prikazano i rasprostranjenje vrste *S. monospina* (plavo) koja je poznata samo iz tri speleološka objekta uz Kotorski zaljev u Crnoj Gori.



Slika 12. Karta rasprostranjenosti kompleksa vrste *S. hercegovinensis*. Boje na karti odgovaraju bojama genetičkih skupina u filogenetskom stablu: sp. 1 - crveno, sp. 2 - zeleno, sp. 3 - ljubičasto, sp. 4 - žuto, sp. 5 - ružičasto, *hercegovinensis* - tamno crveno, *monospina* - plavo. Točke bijele boje označavaju nalaze iz zbirke HBSD-a za koje nisam odredio pripadnost vrsti ili literaturne nalaze vrste *S. hercegovinensis* izvan danas poznatog rasprostranjenja genetske grupe *S. hercegovinensis*.



Slika 13. Uvećani prikaz rasprostranjenosti skupina sp. 1, sp. 2, sp. 5 i nominalne *S. hercegovinensis*. Boje na karti odgovaraju bojama genetičkih skupina u filogenetskom stablu: sp. 1 - crveno, sp. 2 - zeleno, sp. 3 - ljubičasto, sp. 4 - žuto, sp. 5 - ružičasto, *hercegovinensis* - tamno crveno, *monospina* - plavo. Točke bijele boje označavaju nalaze iz zbirke HBSD-a za koje nisam odredio pripadnost vrsti ili literaturne nalaze vrste *S. hercegovinensis* izvan danas poznatog rasprostranjenja genetičke grupe *S. hercegovinensis*.

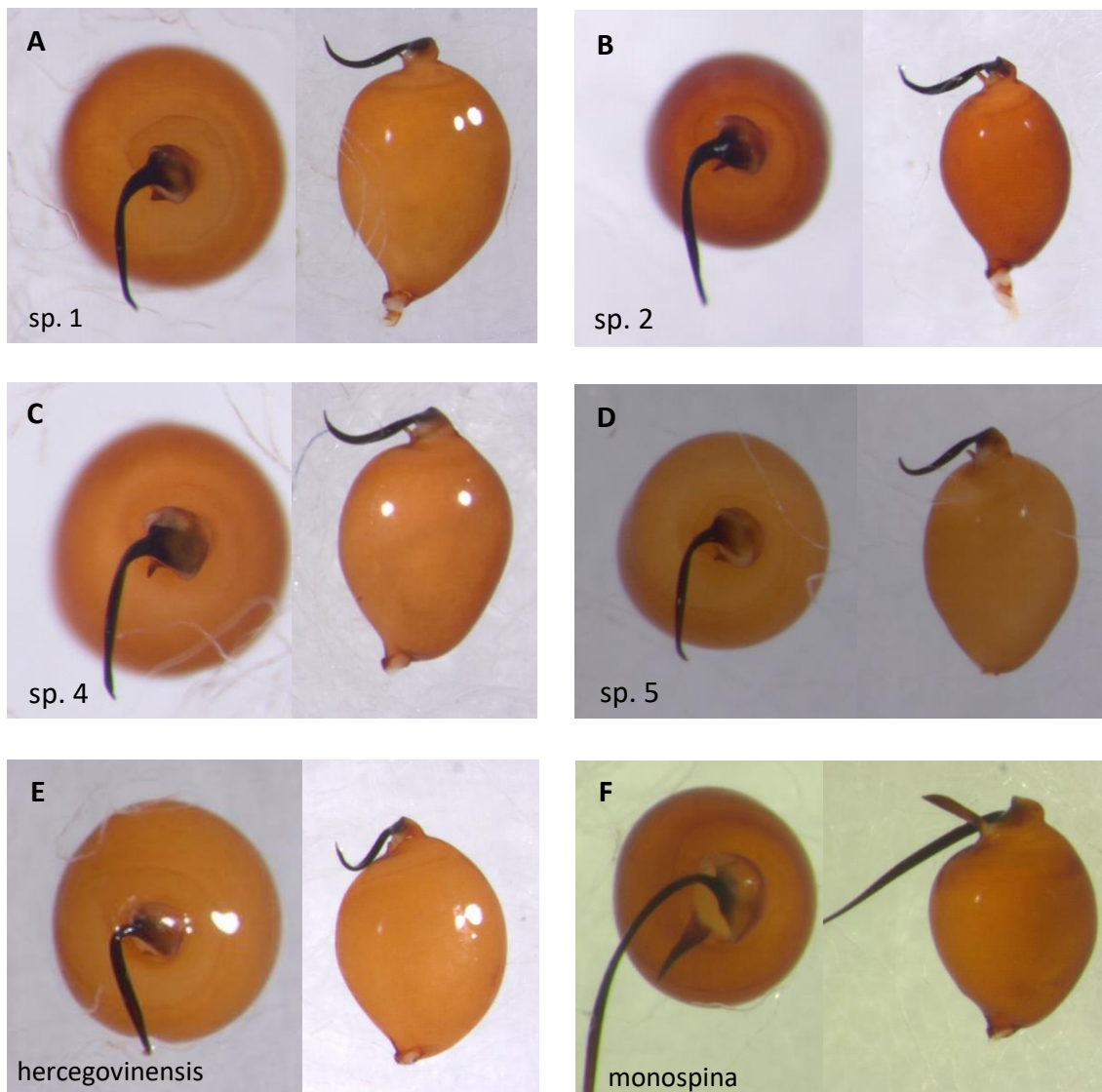
Na temelju rezultata filogenetske analize, delimitacija, mreža i geografije definirali smo 6 skupina unutar kompleksa vrste *S. hercegovinensis* za koje smo dalje testirali morfološke karaktere.

4.3. Rezultati morfoloških analiza

4.3.1. Morfologija spolnih organa

Analizom morfologije spolnih organa uočio sam minimalne razlike u izgledu spolnih organa između skupina. Na Slici 14. prikazana je morfologija desnog bulbosa odabranih jedinki svake skupine fotografirana s lateralne i dorzalne strane. Mužjaci skupine sp. 3 nisu prisutni u zbirci HBSD-a te nisu uvršteni u morfološke analize, a po crtežu iz literature ne mogu se precizno prepoznati bitne značajke. Bulbusi mužjaka većinom dijele isti ili sličan izgled i raspored elemenata, osim jedinki nominalne skupine *hercegovinensis* kod kojih sam uočio drugačiji

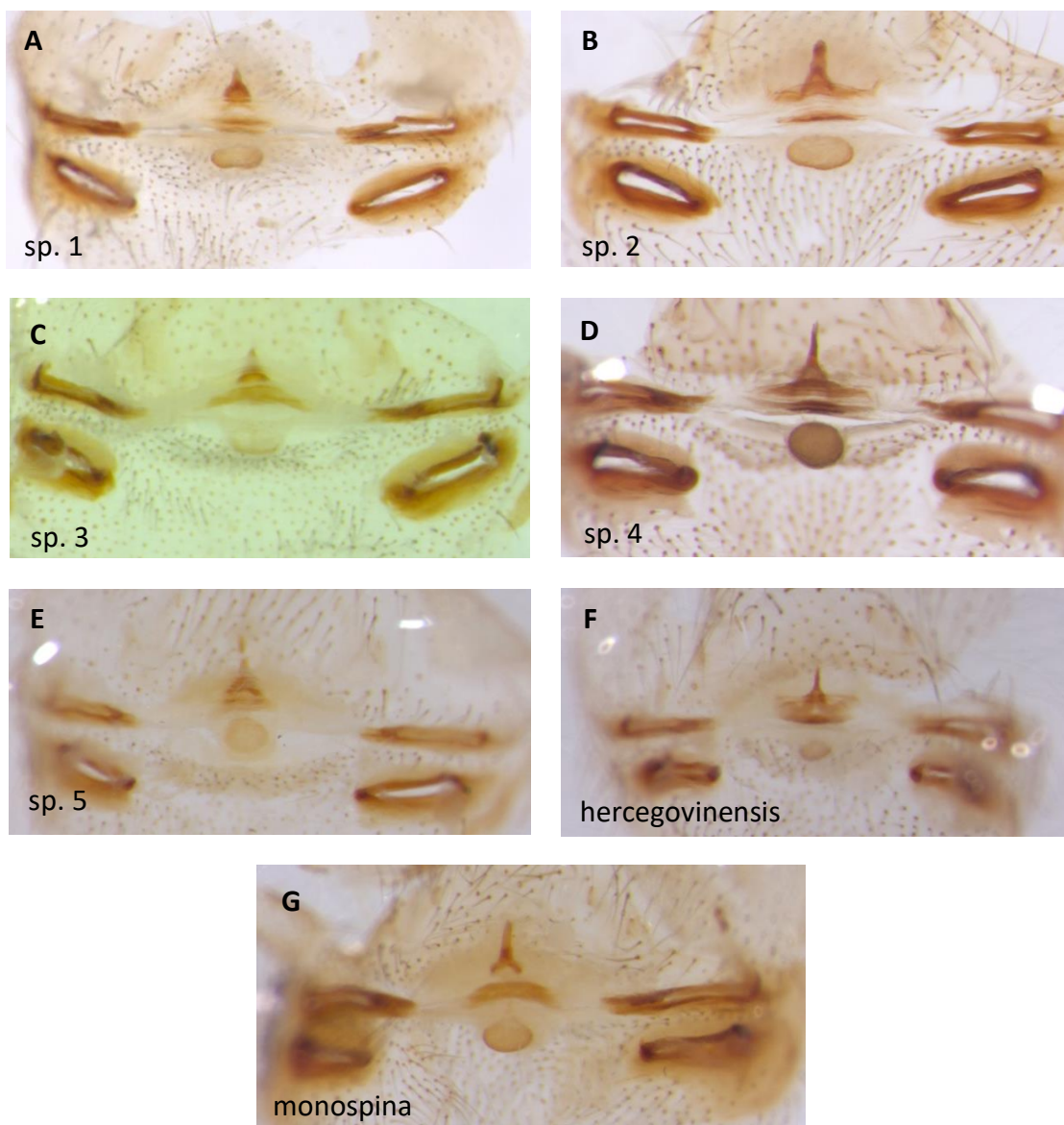
položaj embolusa, koji je više savinut prema tegulumu, znatno kraći i jedva vidljiv konduktor te drugačiji izgled dorzalne, vršne strane bulbusa (Slika 14. E). Od ostalih razlika uočio sam bočno spljošteniji izgled teguluma kod skupine sp. 5 (Slika 14. D) te znatno dulji konduktor kod jednog uzorka skupine sp. 2 (Slika 14. B). Bitno je napomenuti da morfološke razlike u izgledu bulbusa ne prate genetske razlike u potpunosti. Za usporedbu, *S. monospina* ima potpuno drugačiji izgled bulbusa, sa značajno duljim konduktorom i embolusom (Slika 14. F).



Slika 14. Bulbusi mužjaka iz skupina kompleksa vrste *Stalagtia hercegovinensis* (sp. 1, sp. 2, sp. 4, sp. 5, *hercegovinensis*) i vrste *S. monospina* slikani pod lupom. Na lijevoj slici svake skupine prikazan je bulbus slikan s dorzalne strane, a na desnoj bulbus slikan lateralno.

Analizom ženskih spolnih organa uočene su veće razlike između skupina nego kod mužjaka. Na Slici 15. prikazane su fotografije ženskih spolnih organa (vulve) odabranih jedinki svake skupine fotografiranih s dorzalne strane. Kod vrste *S. monospina* i grupa sp. 1 i sp. 3 prednja poprečna ploča ne dodiruje spremateku već se nalazi posteriorno od nje, dodirujući stražnju poprečnu ploču, dok su kod ostale četiri skupine poprečne ploče razdvojene, a prednja se „preklapa“ sa posteriornim krajem spermateke i prekriva ga s dorzalne strane. Kod skupine sp. 1 uočava se znatno kraća i robusnija spermateka (Slika 15. A) nego kod ostalih skupina te se ova značajka konzistentno ponavlja kod svih pregledanih jedinki skupine sp. 1. Skupina sp. 3 (Slika 15. C) ima sličnu strukturu vulve kao *S. monospina* (Slika 15. G), s poprečnim pločama

koje se dodiruju (i zato izgledaju kao jedna debela ploča) te su zakrivljene prema posteriornom dijelu tijela (konkavno u odnosu na spermateku). Apikalni dio spermateke je kod vrste *S. monospina* duži nego kod sp. 3. Kod skupine sp. 2 (Slika 15. B) uočavaju se karakteristične, anteriorono usmjerene izbočine na rubovima prednje poprečne ploče. Ova značajka se također ponavlja kod većine jedinki skupine sp. 2. Skupine sp. 4 (Slika 15. D) i nominalna *hercegovinensis* (Slika 15. F) dijele slične značajke – izdužena spermateka (apikalni dio), poprečne ploče razdvojene, s prednjom koja prelazi preko spermateke. Skupina sp. 5 razlikuje se prema izduženom apikalnom djelu spermateke te manje sklerotiziranim poprečnim pločama, no osim toga pokazuje sličnu morfologiju kao nominalna *hercegovinensis*.



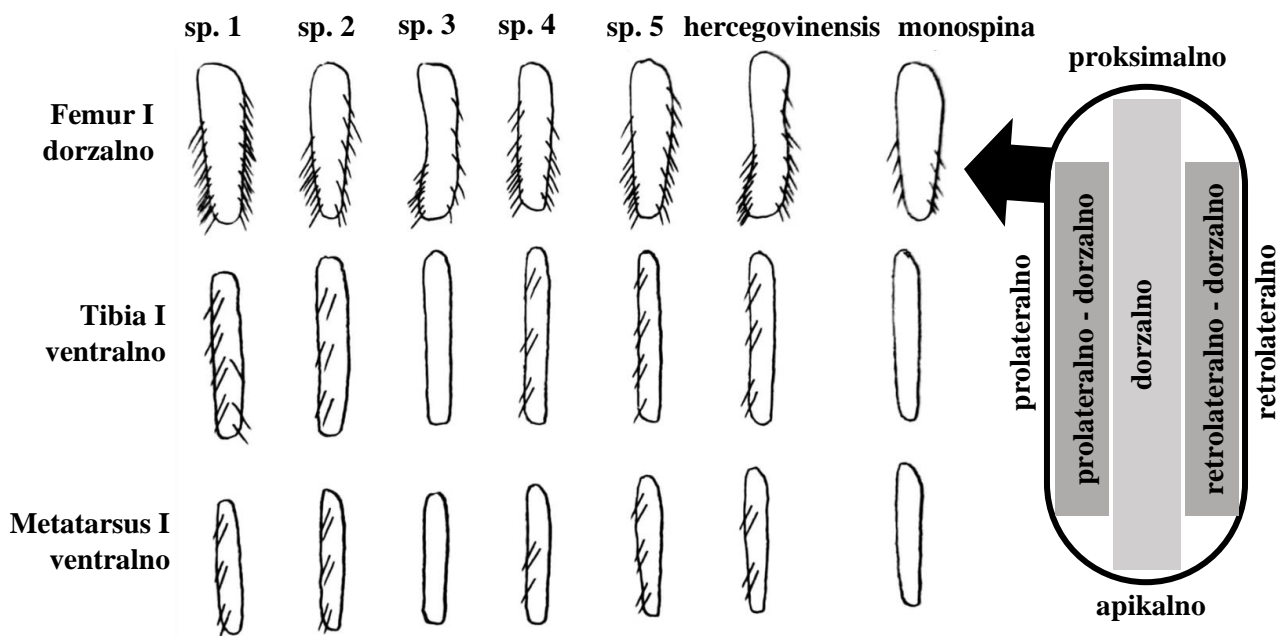
Slika 15. Izolirane vulve ženki iz skupina kompleksa vrste *Stalagtia hercegovinensis* (sp. 1, sp. 2, sp. 3, sp. 4, sp. 5, *hercegovinensis*) i vrste *S. monospina* fotografirane s dorzalne strane pod lupom.

4.3.2. Morfologija somatskih značajki

Nominalna skupina *hercegovinensis* nema funkcionalne oči, ali ima jako reducirane ostatke nekadašnjih očiju, izgleda bijelih točaka koje vjerojatno predstavljaju ostatke leća (Silka 1.). Ovo svojstvo pojavljuje se kod većine jedinki ove skupine, iako ne kod svih. Kod ostalih skupina nema konzistentnog prisustva ili odsustva ostataka očiju, ali unatoč tome, kod skupina sp. 1, sp. 2 i sp. 5 učestalija je odsutnost ikakvih ostataka očiju, pogotovo kod skupine sp. 5 kod koje niti jedna pregledana jedinka nije imala ostatke očiju. Kod skupine sp. 4 uočena je prisutnost ostataka očiju te su kod većine jedinki prisutni samo ostaci anteriornih lateralnih očiju. Kod nominalne skupine *hercegovinensis* uočena je prisutnost ostataka očiju gotovo kod svake jedinke.

Razlike u broju i rasporedu četina na nogama su primjetljive, toliko da se pojedine skupine mogu odvojiti samo prema broju četina. Femur prve noge te tibija i metatarsus prve i druge noge najviše pridonose razlikama u broju četina. Treća i četvrta noga najmanje pridonose razlikama jer su kod svih skupina četine raspoređene nasumično, a broj četina po pojedinom segmentu ne razlikuje se značajno, osim kod skupine sp. 1, kod koje se na trećoj i četvrtoj nozi nalazi veći broj četina nego kod ostalih skupina. Najveće razlike uočavaju se kod skupine sp. 1, koja na femuru i tibiji prve noge ima značajno veći broj četina nego ostale skupine te ima specifičan, nasumičan raspored četina na ventralnoj strani tibije prve i druge noge. Kod skupina sp. 3 i nominalne *hercegovinensis* pojavljuje se specifičan, blago zakrivljeni oblik femura prve noge (gledano s dorzalne strane) te su skoro sve četine na prolateralnoj strani raspoređene apikalno, dok su kod drugih skupina četine raspoređene većim dijelom prolateralne strane (Slika 16.). Kod skupine sp. 3 uočen je općenito manji broj četina, a kod nekih jedinki četina uopće nema na tibijama i metatarsusima prednjih nogu. Kod pojedinih mužjaka jedinki nominalne *hercegovinensis* uočena je ista pojava manjka četina na tibijama i metatarsusima prednjih nogu te ovo svojstvo može poslužiti za razlikovanje mužjaka nominalne skupine *hercegovinensis* od ostalih skupina. Skupine sp. 2 i sp. 5 pokazuju vrlo sličan broj i raspored četina na svim nogama. Razlike su također uočene u broju četina na metatarsusu prve noge, na kojem skupine sp. 1, sp. 2 i sp. 5 imaju 6 do 7 četina, dok skupine sp. 3, sp. 4 i *hercegovinensis* imaju manje od 6 četina. (Slika 16.) Na dorzalnoj strani femura prve noge kod nekih jedinki uočena je pojava jedne četine, no ovo svojstvo pojavljuje se sporadično unutar skoro svih skupina te vjerojatno nije značajno za razlikovanje niti za determinaciju skupina.

Na uzorcima iz Špilje za Gromačkom vlakom uočeno je da se u istoj špilji pojavljuju dvije skupine, sp. 5 i nominalna *hercegovinensis*. Primijećeno je da se jedinke ove dvije skupine konzistentno mogu razlikovati prema broju četina na tibiji i metatarsusu prve noge (Slika 16.), prisutnosti ostataka očiju (sp. 5 nema ostatke očiju, a *hercegovinensis* ima) te prema morfologiji bulbusa.



Slika 16. Shematski prikaz okvirnog broja i rasporeda četina na segmentima prve noge kod svih skupina te shematski prikaz elemenata orijentacije segmenta prednje noge pri kojem crna strelica označava položaj prednjeg tijela pauka.

Mjerenjem je uočeno da su jedinke skupine sp. 1 općenito veće od jedinki drugih skupina. Primijećeno je da kod skupina sp. 4 i nominalne *hercegovinensis* svi analizirani mužjaci imaju femur prve noge duži od duljine prednjeg dijela tijela. Pretpostavljam da kod skupine sp. 3 dolazi do iste pojave budući da morfološki pokazuje sličnost sa skupinama sp. 4 i nominalnom *hercegovinensis*, no budući da mužjaci te skupine nisu nađeni, to se trenutno ne može potvrditi. Ostale izmjerene vrijednosti zabilježene su u tablici te su provedene statističke analize (PCA, selekcija značajnih varijabli, *decision tree*) da se utvrdi između kojih vrijednosti postoje značajne razlike među skupinama.

4.4. Statističke analize

4.4.1. Selekcija značajnih varijabli

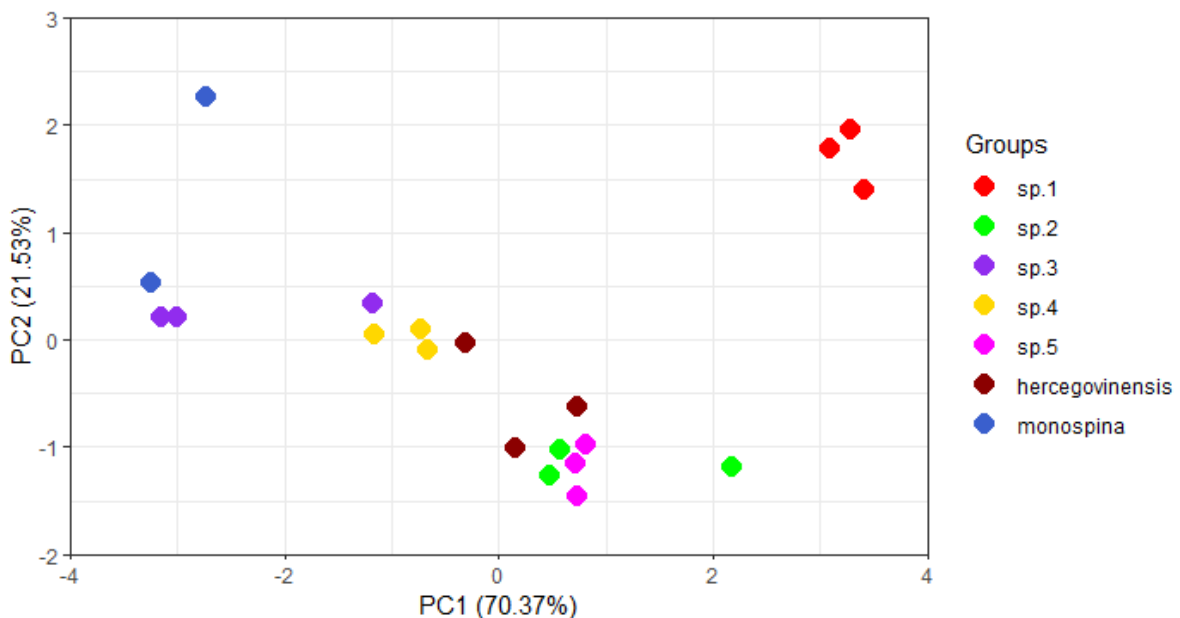
Nad svim varijablama iz Tablice 4. napravljena je selekcija značajnosti pomoću algoritma *Boruta* u programu RStudio. Metoda *Boruta* izabrala je broj četina na retrolateralnoj (F1_retrolateralno) i retrolateralno-dorzalnoj strani femura prve noge (F1_retrolatdor), broj četina na ventralnoj strani tibije (T1_ventralno) i metatarsusa prve noge (MT1_ventralno), broj četina na ventralnoj strani tibije (T2_ventralno) i metatarsusa druge noge (MT2_ventralno) kao najznačajnije varijable koje opisuju najviše varijabilnosti u ovom setu podataka. Varijable: F1_prolateralno, F2_retrolatdor, F2_retrolateralno, F2_prolatven, T3_random, T4_random,

t1l_L, t4l_L, t4w_L, t1w_L_adj i t4w_L_adj algoritam Boruta označava kao potencijalno značajne.

Broj četina na segmentima treće i četvrte noge te nemodificirana mjerenja pokazala su se kao varijable bez značajnosti za razlikovanje skupina.

4.4.2. PCA

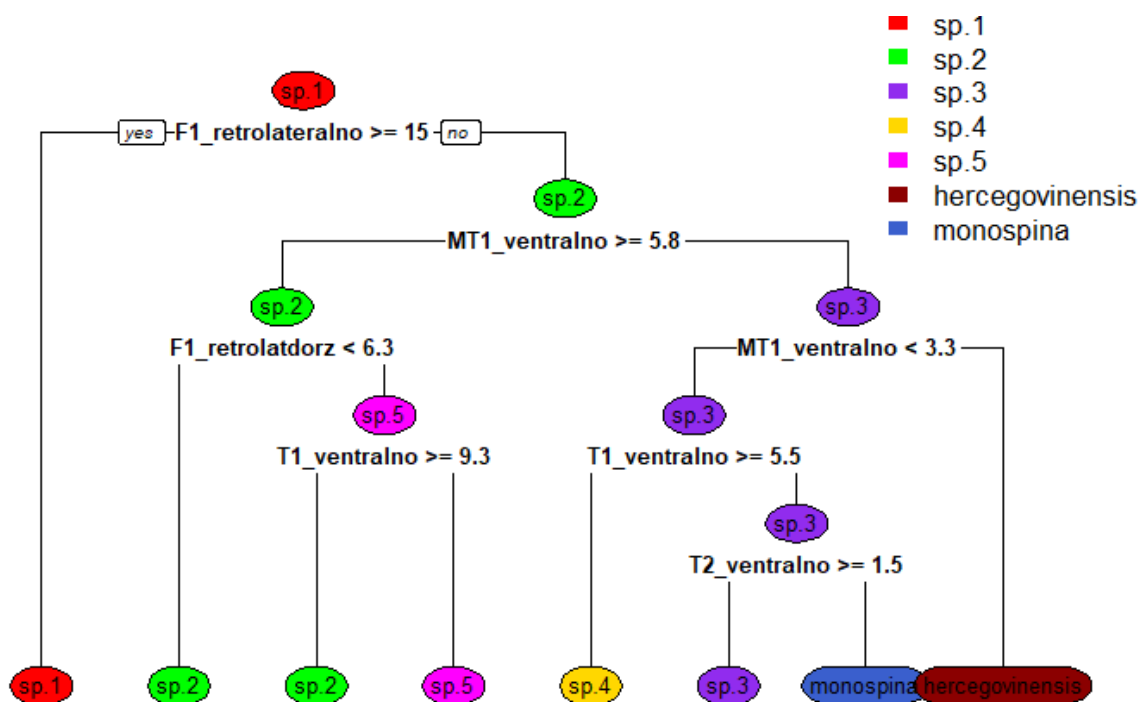
Nad odabranim značajnim varijablama filtriranim kroz opciju *feature selection* napravljena je analiza metodom PCA. Sve varijable su kondenzirane u dvije glavne komponente, od kojih prva opisuje najveći dio varijabilnosti, 70,37 %, dok druga komponenta opisuje 21,35 % varijabilnosti, što je ukupno 91,90 % varijabilnosti. Prvoj komponenti najviše pridonose F1_retrolateralno, MT1_ventralno, T1_ventralno, MT2_ventralno i T2_ventralno s pozitivnim koeficijentom. Drugoj komponenti najviše pridonosi F1_retrolatdorz s negativnim koeficijentom. Na grafičkom prikazu s dvije glavne komponente na osima (Slika 17.), jasno se vidi odvojenost skupine sp. 1 i vrste *S. monospina* dok je granica ostalih skupina relativno nejasna. Djelomična odvojenost ostalih skupina uočava se kod skupine sp. 4 te grupe sp. 2 i sp. 5, no budući da se nominalna *hercegovinensis* nalazi u prostoru između i da se grupira sa skupinama sp. 4, sp. 5 i sp. 2, ne postoji jasno odvajanje ovih skupina.



Slika 17. Grafički prikaz rezultata analize PCA s vrijednostima glavnih komponenti na osima.

4.4.3. Analiza *decision tree*

Decision tree analiza, napravljena pomoću paketa *rpart* u programu R koristeći odabrane varijable, dala je potencijalni determinacijski ključ prikazan na Slici 18.



Slika 18. Rezultat *decision tree* analize napravljene pomoću paketa *rpart* u programu RStudio, koristeći varijable: F1_retrolateralno, MT1_ventralno, T1_ventralno, MT2_ventralno i T2_ventralno uz dodatne postavke funkcije: *method = "class"*, *control=rpart.control(minsplit=1, minbucket=1, cp=0.001)*.

Na Slici 18. vidi se podjela na tri skupine: skupina sp. 1, skupine sp. 2 i sp. 5 te skupina sp. 4, sp. 5, *hercegovinensis* i *monospina*. Skupina sp. 1 razdvaja se prema broju četina na retrolateralnoj strani femura 1 jer jedinke skupine sp. 1 imaju više od 15 četina na retrolateralnoj strani femura 1 i to nasumično raspoređenih, za razliku od drugih skupina kod kojih je uvijek prisutno manje od 15 četina koje su organizirane u pravilne redove. Nakon odvajanja skupine sp. 1 prema F1_retrolateralno, dvije veće skupine, prva sp. 2 i sp. 5, i druga sp. 3, sp. 4, *hercegovinensis* i *monospina*, odvajaju se prema broju četina na metatarsusu 1. Ova raspodjela također ima smisla jer je razlika uočena u svim skupinama bez iznimaka: skupine sp. 2 i sp. 5 konzistentno imaju 6 ili više četina, dok skupine sp. 3, sp. 4 i *hercegovinensis* imaju manje od 6 četina na metatarsusu 1. Zaokružena vrijednost broja četina (6) uzeta je umjesto vrijednosti 5,8 kao što je na Slici 18. jer vrijednost 5,8 biološki nema smisla za broj četina. Razlike među skupinama sp. 3, sp. 4 i *hercegovinensis* u stablu imaju smisla, no upitno je koliko bi budućem determinatoru bile od koristi upravo zbog velike varijabilnosti unutar nominalne skupine *hercegovinensis* i bliskih vrijednosti broja četina koje se mogu lako

zamijeniti. Logičnija podjela između ovih skupina bila bi prema broju vidljivih ostataka očiju, obliku femura 1 te morfologiji spolnih organa. Skupine sp. 2 i sp. 5 također se teže odvajaju prema broju četina tako da bi i u ovom slučaju bolja podjela bila prema morfologiji ženskih spolnih organa.

5. RASPRAVA

5.1. Distribucija skupina kompleksa vrste *Stalagtia hercegovinensis*

Zbog velike površine na kojoj je vrsta *Stalagtia hercegovinensis* rasprostranjena bilo je za očekivati neku razinu diverzifikacije. Naime, za većinu podzemnih vrsta s povijesno velikim arealima (preko nekoliko stotina kilometara) se je upotrebom genetičkih alata pokazalo da su to u biti kompleksi vrsta (Trontelj 2018). Slikovit primjer toga dolazi iz Dinarida, i to za najpoznatiju dinarsku vrstu, čovječju ribicu, za koju je nedavno pokazano da je u biti kompleks od čak devet neovisnih populacija za koje postoji dovoljno genetičkih dokaza da se mogu smatrati odvojenim vrstama (Recknagel i sur. 2023). Ipak, šest neovisnih genetičkih skupina unutar vrste *S. hercegovinensis* je bilo pravo iznenađenje.

Prema rezultatima, uočljivo je da su genetičke skupine identificirane u filogenetskim analizama jasno odvojene i geografski. Točne granice između skupina nisu sasvim jasne zbog nedostatka materijala u zbirci HBSD-a u graničnim područjima ili zbog nemogućnosti određivanja novo prepoznatih skupina samo na temelju opisa iz literature (bijeće točke na Slici 12). Ovo je posebno izraženo u području oko grada Trebinja u BiH za koje postoji puno povijesnih nalaza, a slabo je istraživano recentno. Zanimljive su razlike u arealima pojedinih vrsta. Skupina sp. 4 ima areal veći od svih drugih skupina zajedno (5000 km² naprema 3700 km²), dok se na području Grebaca na granici Hrvatske i BiH nalaze čak tri skupine na površini od svega 100 kvadratnih kilometara. Područje krajnjeg juga Dinarida, na kojem se Grebci nalaze, prepoznato je kao vruća točka unutar vruće točke svjetske podzemne bioraznolikosti (tj. cijelih Dinarida) (Culver i sur. 2021) te se to očito odražava i na rod *Stalagtia*.

Na tom području nalaze se skupine sp. 2, sp. 5 i nominalna *hercegovinensis* koje se genetski i morfološki jasno odvajaju međusobno. Posebno je zanimljiva, i potpuno neočekivana, činjenica da skupine sp. 5 i *hercegovinensis* dolaze u istom speleološkom objektu, u Špilji za Gromačkom vlakom. Pojava dvije srodne vrste na istom geografskom području naziva se simpatrija, no u ovom slučaju može se govoriti i o sintopiji, odnosno užem pojmu od simpatrije, gdje dvije srodne vrste dijele isti (špiljski) lokalitet. Sintopija je poznata kod pojedinih vrsta

špiljskih Isopoda na ovom području (Bedek 2019), no kod špiljskih pauka ova je pojava jako rijetka i događa se samo u specifičnim situacijama. U porodici Dysderidae (kojoj rod *Stalagtia* pripada) do sada nije zabilježeno da vrste iz istog roda dolaze u istoj špilji, ali na sjevernim Dinaridima dolaze vrste iz sestrinskih rodova *Stalita* i *Parastalita*. One se morfološki razlikuju jedino u obliku čeljusti što se povezuje s mogućom trofičkom specijalizacijom kod roda *Parastalita* i posljedično različitim ekološkim nišama koje ovi pauzi zauzimaju i koje im omogućuju sintopiju i simpatriju (Pavlek i Mammola 2021). Sintopija unutar istog roda zabilježena je samo kod roda *Troglohyphantes* (porodica Linyphiidae), i to uvijek između vrsta sa različitim stupnjem troglomorije (potpuno slijepa i vrsta s očima) ili udaljenih vrsta tj. vrsta koje ne pripadaju istoj grupi (Deeleman-Reinhold 1978). Pripadnost nesrodnim grupama skupina sp. 5 i *hercegovinensis* (Slika 9.) može objasniti njihovu sintopiju, iako ne postoji vidljiva razlika u ekološkim nišama koje bi ove svojite zauzimale. Njihova sintopija vjerojatno je posljedica sekundarnog kontakta i bilo bi zanimljivo detaljnije istražiti ovo područje da se utvrdi dolaze li u još nekom speleološkom objektu zajedno.

Geografska granica između skupina sp. 4 i *hercegovinensis* također nije potpuno jasna zbog nedostatka istraživanja špilja i jama na području Bosne i Hercegovine kod grada Neuma, no sigurno je se da skupina sp. 4 nalazi s obje strane rijeke Neretve. U Bosni i Hercegovini, između skupina *hercegovinensis* i sp. 3 postoji veliko područje bez ikakvih nalaza te je potrebno provesti još terenskih istraživanja u ovom području. Geografska odvojenost skupine sp. 1 jedina je uistinu jasna te je odvajanje od ostalih skupina dobro potvrđeno i genetski i morfološki.

5.2. Morfološke značajke u usporedbi sa starim radovima

Morfološkom analizom ustanovljena je varijabilnost oblika spolnih organa ženki među skupinama te u puno manjoj mjeri među mužjacima. Ovo je primijetila i Christa Deeleman-Reinhold (1993), ali s obzirom na manji broj analiziranih uzoraka, na manju geografsku pokrivenost, na relativnu raznolikost morfologije spolnih organa te raznolikost rasporeda i broja četina na nogama, Deeleman-Reinhold nije mogla uočiti pravilnost u uzorcima nego je zadržala jednu vrstu, *S. hercegovinensis*, s komentarom da je iznimno varijabilna. Upotreba rezultata DNA analiza pokazala se ključnom u prepoznavanju skupina za koje su se zatim tražile morfološke razlike.

Kratochvíl (1970) je u svom značajnom radu o dinarskim špiljskim vrstama iz porodice Dysderidae opisao vrstu *S. purkrabeki*. Prema opisu i crtežu ženskih spolnih organa te

lokalitetu na kojem je nađena (špilja Šipun u Cavtatu), odgovara skupini sp. 1, no spolni organ mužjaka je sličniji mljetskoj vrsti *Folkea inermis*. Opis rasporeda četina također ne odgovara skupini sp. 1 te se čini da je Kratochvíl opisao vrstu *purkrabeki* na temelju mužjaka i ženke iz različitih, čak jako udaljenih, lokaliteta, na što također sumnja i Deeleman-Reinhold (1993). Stoga zaključujem da skupina sp. 1 odgovara ženki vrste *S. purkrabeki*, da bi to ime trebalo ponovno postati valjano i da se mužjak vrste treba nanovo opisati.

Kratochvíl (1970) opisuje i vrstu *S. folki* koja morfologijom i područjem na kojem je tipski lokalitet odgovara skupini sp. 3, no opisana je na temelju samo jednog mužjaka, što predstavlja problem jer u materijalu zbirke HBSD-a ne postoji nijedan mužjak skupine sp. 3. Prilikom opisa vrste *S. folki*, Kratochvíl također spominje sličnost sa *S. hercegovinensis*, no spominje razliku u broju četina na tibiji i metatarsusu prve i druge noge koja je primijećena i u ovom radu kod skupine sp. 3. S obzirom da je kod skupine sp. 3 ipak zabilježen različit broj četina kod jedinke iz Radove pećine, a kod pojedinih jedinki *S. hercegovinensis* iz Taleže pećine zabilježen raspored četina sličan skupini sp. 3, valjanost ove morfološke značajke dovodi se u pitanje jer se ne pojavljuje konzistentno. Ako će skupina sp. 3 biti opisana kao zasebna vrsta, trebalo bi pronaći mužjaka te ga usporediti s opisom spolnog organa vrste *S. folki* (Kratochvíl 1970). Budući da se ne znaju točne koordinate tipskog lokaliteta iz kojeg je opisana *S. folki*, Bobjerske pećine u Crnoj Gori, bilo bi dobro pronaći taj lokalitet te iz njega prikupiti jedinke roda *Stalagtia*. Ako se utvrdi definitivna razlika u strukturi muških i ženskih spolnih organa od *S. hercegovinensis*, može se vratiti vrsta *S. folki* sa spolnim organima kao glavnim determinacijskim svojstvom. Uz genetske podatke, koji skupinu sp. 3 odvajaju kao zasebnu vrstu te zabilježene morfološke razlike, argumenti za vraćanje vrste *S. folki* postaju značajno jači.

Skupine sp. 2, sp. 4 i sp. 5 nisu prepoznate od prošlih autora kao različite od nominalne *hercegovinensis*, vjerojatno zbog velike morfološke sličnosti s njom koja je bila pripisana unutarvrstnoj varijaciji. Ovim radom ipak su utvrđene razlike između ovih skupina, primarno genetički, ali i morfološki. Na temelju broja četina na metatarsusu 1 te morfologiji spolnih organa, skupine sp. 2 i sp. 5 mogu se odvojiti od ostalih skupina.

Velika morfološka sličnost muških spolnih organa također predstavlja zanimljiv aspekt ovog rada. Kako navodi Deeleman-Reinhold (1993), oblik i veličina bulbosa nisu važne značajke u razlikovanju vrsta kod rodova potporodice Harpacteinae, jer u vulvu ženke ne ulazi cijeli bulbos. Budući da je struktura bulbosa između skupina vrlo slična, postoji mogućnost da

mužjaci mogu oploditi ženke različitih skupina. Iako ovaj slučaj nije vjerojatan, jer su skupine genetički jako jasno odijeljene, mogao bi se dokazati uzgojem pauka različitih skupina u laboratoriju te provjerom mogućnost međusobnog parenja između skupina.

5.3. Učinkovitost statističkih analiza

Statističke analize somatskih značajki čak i na malom broju uzoraka po skupini detektiraju značajnu razliku između skupina. Do problema dolazi kada su skupine morfološki previše slične prema analiziranim značajkama (sp. 2 i sp. 5) ili kada unutar skupine postoji previše morfološke varijabilnosti (nominalna *hercegovinensis*). U ovim slučajevima trebalo bi se uključiti više jedinki te analizirati više morfoloških značajki uključujući oblik spolnih organa, utjecaj spola i korištenje geometrijske morfometrije kao što je već prethodno uspješno korišteno na paucima (Sagastume-Espinoza i sur. 2024, Wilson i sur. 2021) te paucima porodice Dysderidae (Minjares Grajeda 2024).

5.4. Utjecaj na konzervaciju

Opisom prepoznatih genetičkih skupina kao novih vrsta roda *Stalagtia* ustanovila bi se endemičnost tih skupina, posebno na području južne Dalmacije oko Dubrovnika (sp.1, sp.2, sp.5). Opisom prepoznatih genetičkih skupina kao novih vrsta roda *Stalagtia* povećao bi se broj vrsta roda *Stalagtia* na ovom području s jedne vrste s jako velikim arealom na šest vrsta sa značajno manjim arealima. To bi imalo značajan utjecaj na procjenu ugroženosti tih svojti jer su neke od njih poznate s jako malog područja (npr. skupina sp. 5). Ova činjenica postaje značajna s obzirom na planiranu gradnju autoceste do Dubrovnika koja će proći točno preko područja gdje obitavaju tri skupine, od kojih su dvije (sp. 5 i sp. 2) poznate s malog broja lokacija te će planirana gradnja potencijalno znatno promijeniti okoliš u kojem obitavaju.

Uz već mnoge druge nove i potencijalno nove vrste opisane s tog područja (Delić i sur. 2023), nove vrste roda *Stalagtia* pridonijele bi značajnosti južnih Dinarida kao vruće točke raznolikosti podzemne faune u Hrvatskoj.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju filogenetske analize konkateniranih sekvenci gena *COI*, 16S, 18S, 28S i *H3* metodama *Maximum likelihood* i *MrBayes* te analize sekvenci gena *COI* metodama za razgraničavanje vrsta ASAP, BGD i bPTP može se zaključiti da se vrsta *Stalagtia hercegovinensis* dijeli u 6 visoko podržanih monofiletskih skupina: sp. 1, sp. 2, sp. 3, sp. 4, sp. 5 i nominalna *hercegovinensis*. Sve identificirane skupine geografski su odvojene s većinom

jasnim granicama. Skupine sp. 5 i nominalna *hercegovinensis* dolaze u bliski kontakt, a u speleološkom objektu Špilja za Gromačkom vlakom dolazi do sintopije ove dvije skupine.

Morfološkom analizom utvrđene su razlike između skupina identificiranih na filogenetskom stablu. Prema morfologiji četina, skupine se dijele se u dvije veće grupe: sp. 1, sp. 2 i sp. 5 te sp. 3, sp. 4 i nominalna *hercegovinensis*. Skupine sp. 1, sp. 2 i sp. 5 na metatarsusu prve noge imaju barem 6 četina dok se kod ostalih skupina na metatarsusu prve noge pojavljuje manje od šest četina, najčešće četiri kod skupina sp. 4 te nominalne *hercegovinensis*, odnosno niti jedna kod skupine sp. 3. Skupina sp. 1 se od ostalih izdvaja prema znatno većem broju četina na femuru (više od 30) i tibiji prve noge (više od 8 nasumično raspoređenih četina s ventralne strane). Kod skupina sp. 3 i nominalne *hercegovinensis* zabilježen je blago zakrivljeni oblik femura prve noge.

Analizom muških spolnih organa jedino su kod nominalne *hercegovinensis* ustanovljene značajne razlike u morfologiji bulbosa u odnosu na druge skupine. Analiza ženskih spolnih organa pokazala je uočljive i jedinstvene razlike u skoro svim skupinama. Jedino se kod nominalne *hercegovinensis* i skupine sp. 4 ne uočavaju jasne razlike u morfologiji ženskih spolnih organa.

Linearna mjerenja duljine, širine i visine prednjeg tijela te duljine i širine tibije prve i četvrte noge nisu se pokazala kao značajne u razdvajanju skupina.

Zaključno, korištenjem filogenetskih i morfoloških analiza, prikupljeno je dovoljno dokaza da je vrsta *S. hercegovinensis* zapravo kompleks od 6 vrsta koje su geografski jasno odvojene i koje se mogu većinom konzistentno morfološki razlikovati. Ovim istraživanjem postavlja se temelj za budući opis novih vrsta špiljskih pauka iz roda *Stalagtia*.

7. LITERATURA

Absolon, K., Kratochvíl, J. (1933): Über hohlenbewohnende Arachniden. **Časopis Moravského Zemského Musea v Brne** 29: 595-600.

Adrián-Serrano, S., Pavlek, M., Arnedo, M. A. (2024): A targeted gene phylogenetic framework to investigate diversification in the highly diverse yet geographically restricted red devil spiders (Araneae, Dysderidae). **Cladistics** 40 (6): 577-597.
<https://doi.org/10.1111/cla.12595>

Arnedo, M. A., Oromí, P., Múrria, C., Macías-Hernández, N., Ribera, C. (2007): The dark side of an island radiation: systematics and evolution of troglobitic spiders of the genus *Dysdera* Latreille (Araneae: Dysderidae) in the Canary Islands. **Invertebrate Systematics** 21 (6): 623-660. <https://doi.org/10.1071/IS07015>

Arnedo, M. A., Oromí, P., Ribera, C. (2001): Radiation of the Spider Genus *Dysdera* (Araneae, Dysderidae) in the Canary Islands: Cladistic Assessment Based on Multiple Data Sets. **Cladistics** 17 (4): 313-353. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2001.tb00129.x>

Bedek, J. (2019): Morphology and molecular phylogeny of the cave dwelling subgenus *Illyrionethes* Verhoeff, 1927 (Isopoda, Trichoniscidae) in the Dinaric Karst. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.

Christiansen, K. (2012): Morphological adaptations. U: White, W. B., Culver, D. C. (ur.) Encyclopedia of caves. Amsterdam, Elsevier, str. 517-528. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-64793-6>

Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D., Crandall, K. (2004): TCS: estimating gene genealogies. **Proceedings of the 16th International Parallel and Distributed Processing Symposium** 311 (4): 1110-1116.

Colgan, D. J., McLauchlan, A., Wilson, G. D., Livingston, S. P., Edgecombe, G. D., Macaranas, J., Cassis, G., Gray, M. R. (1998): Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. **Australian Journal of Zoology** 46 (5): 419-437.

Culver, D. C., Deharveng, L., Pipan, T., Bedos, A. (2021): An overview of subterranean biodiversity hotspots. **Diversity** 13 (10): 487. <https://doi.org/10.3390/d13100487>

Culver, D. C., Pipan, T. (2019): The biology of caves and other subterranean habitats. Oxford University Press, Oxford.

Deeleman-Reinhold, C. L. (1978): Revision of the cave-dwelling and related spiders of the genus *Troglohyphantes* Joseph (Linyphiidae), with special reference to the Yugoslav species. Biološki inštitut Jovana Hadžija, Ljubljana.

Deeleman-Reinhold, C. L. (1993): The genus *Rhode* and the harpacteine genera *Stalagtia*, *Folkia*, *Minotauria*, and *Kaemis* (Araneae, Dysteridae) of Yugoslavia and Crete, with remarks on the genus *Harpactea*. **Revue arachnologique** 10 (6): 105-135.

Deharveng, L., Bedos, A., Pipan, T., Culver, D. C. (2024): Global subterranean biodiversity: A unique pattern. **Diversity** 16 (3): 157. <https://doi.org/10.3390/d16030157>

Delić, T., Pipan, T., Ozimec, R., Culver, D. C., Zagamajster, M. (2023): The subterranean species of the Vjetrenica Cave System in Bosnia and Herzegovina. **Diversity** 15 (8): 912. <https://doi.org/10.3390/d15080912>

Fišer Pečnikar, Ž., Bužan, E. V. (2014): 20 years since the introduction of DNA barcoding: from theory to application. **Journal of applied genetics** 55: 43-52. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0180-y>

Giribet, G., Carranza, S., Bagañà, J., Riutort, M., Ribera, C. (1996): First molecular evidence for the existence of a Tardigrada + Arthropoda clade. **Molecular biology and evolution** 13 (1): 76-84. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025573>

Hajna, N. Z. (2019): Dinaric karst – Geography and geology. U: White, W. B., Culver, D. C., Pipan, T. (ur.) Encyclopedia of caves. Amsterdam, Elsevier, str. 353-362.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., De Waard, J. R. (2003a): Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences** 270 (1512): 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>

Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., De Waard, J. R. (2003b): Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences** 270 (suppl_1): S96-S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>

Hedin, M. C., Maddison, W. P. (2001): A combined molecular approach to phylogeny of the jumping spider subfamily Dendryphantinae (Araneae: Salticidae). **Molecular phylogenetics and evolution** 18 (3): 386-403. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0883>

Heimer, S., Nentwig, W. (1991): Spinnen Mitteleuropas. Verlag Paul Parey, Berlin i Hamburg.

Hubert, N., Phillips, J. D., Hanner, R. H. (2024): Delimiting Species with Single-Locus DNA Sequences. U: DeSalle, R. (ur.) DNA Barcoding. New York, Springer US, str. 53-76.

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K., Von Haeseler, A., Jermini, L. S. (2017): ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature methods** 14 (6): 587-589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T. (2002): MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic acids research** 30 (14): 3059-3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C. (2012): Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics** 28 (12): 1647-1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>

Kratochvíl, J. (1970): Cavernicole Dysderae. **Acta scientiarum naturalium Academiae Scientiarum Bohemicae, Brno** 4: 1-62.

Kursa, M. B., Jankowski, A., Rudnicki, W. R. (2010): Boruta—a system for feature selection. **Fundamenta Informaticae** 101 (4): 271-285. <https://doi.org/10.3233/FI-2010-288>

Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., Calcott, B. (2017): PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. **Molecular biology and evolution** 34 (3): 772-773. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>

Leigh, J. W., Bryant, D., Nakagawa, S. (2015): POPART: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology & Evolution** 6 (9): 1110-1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>

Letunic, I., Bork, P. (2021): Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Nucleic acids research** 49 (W1): W293-W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>

Mammola, S., Cardoso, P., Angyal, D., Balázs, G., Blick, T., Brustel, H., Carter, J., Čurčić, S., Danflous, S., Dányi, L. (2019): Continental data on cave-dwelling spider communities across

Europe (Arachnida: Araneae). **Biodiversity Data Journal** 7: e38492.
<https://doi.org/10.3897/BDJ.7.e38492>

Mammola, S., Pavlek, M., Huber, B. A., Isaia, M., Ballarin, F., Tolve, M., Čupić, I., Hesselberg, T., Lunghi, E., Mouron, S. (2022): A trait database and updated checklist for European subterranean spiders. **Scientific data** 9 (1): 236. <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01316-3>

Marcus, W. B. (2017): ggord: ordination Plots with ggplot2. R package version 1.1.8. <https://zenodo.org/badge/latestdoi/35334615> (pristupljeno 13.1.2025.)

Milborrow, S. (2019): Plot 'rpart' models: an enhanced version of 'plot.rpart.' R package version. <http://www.milbo.org/rpart-plot/>

Miller, M. A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. (2010): Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. U: Miller, M. A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. (ur.), 2010 gateway computing environments workshop (GCE), IEEE, Piscataway, str. 1-8.

Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., Lanfear, R. (2020): IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. **Molecular biology and evolution** 37 (5): 1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>

Minjares Grajeda, M. R. (2024): Patterns of morphological diversification in dwarf red devil spiders (Araneae, Dysderidae, Harpacteinae), Diplomski rad, University of Barcelona, Faculty of Biology, Department of Evolutionary Ecology and Environmental Sciences, Unit of Zoology and Biological Anthropology, Barcelona.

Moya-Laraño, J., Macías-Ordóñez, R., Blanckenhorn, W. U., Fernández-Montraveta, C. (2008): Analysing body condition: mass, volume or density?. **Journal of Animal Ecology** 77 (6): 1099-1108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01433.x>

Nentwig, W., Blick, T., Bosmans, R., Hänggi, A., Kropf, C., Stäubli, A. (2025): Spiders of Europe. Version 01. 2025. <https://www.araneae.nmbe.ch>

Nosek, A. (1905): Die Arachniden der herzogwinischen Höhlen. **Verhandlungen der Kaiserlich-Königlichen Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien** 55: 212-221.

- Pavlek, M., Mammola, S. (2021): Niche-based processes explaining the distributions of closely related subterranean spiders. **Journal of Biogeography** 48 (1): 118-133. <https://doi.org/10.1111/jbi.13987>
- Pekár, S., Toft, S. (2015): Trophic specialisation in a predatory group: the case of prey-specialised spiders (Araneae). **Biological Reviews** 90 (3): 744-761. <https://doi.org/10.1111/brv.12133>
- Platania, L., Pavlek, M., Arnedo, M. (2020): Testing the monophyly of the ground-dweller spider genus *Harpactea* Bristowe, 1939 (Araneae, Dysderidae) with the description of three new species. **Systematics and Biodiversity** 18 (7): 688-707. <https://doi.org/10.1080/14772000.2020.1776786> (pristupljeno 10.1.2025.)
- Posit team (2024): RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. <http://www.posit.co/>
- Puillandre, N., Brouillet, S., Achaz, G. (2021): ASAP: assemble species by automatic partitioning. **Molecular Ecology Resources** 21 (2): 609-620. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., Achaz, G. (2012): ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology** 21 (8): 1864-1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- QGIS.org, 2025. QGIS Geographic Information System. QGIS Association. <http://www.qgis.org>
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., Suchard, M. A. (2018): Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic biology** 67 (5): 901-904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Recknagel, H., Zakšek, V., Delić, T., Gorički, Š., Trontelj, P. (2024): Multiple transitions between realms shape relict lineages of *Proteus* cave salamanders. **Molecular Ecology** 33 (8): e16868. <https://doi.org/10.1111/mec.16868>

Řezáč, M., Pekár, S., Lubin, Y. (2008): How oniscophagous spiders overcome woodlouse armour. **Journal of Zoology** 275 (1): 64-71. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2007.00408.x>

Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P. (2003): MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** 19 (12): 1572-1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>

Růžička, V., Kůrka, A., Buchar, J., Řezáč, M. (2005): Czech Republic—the type material of spiders (Araneae). **Časopis Národního muzea, Řada přírodovědná** 174 (1-4): 13-64.

Sagastume-Espinoza, K. O., Simmons, L. W., Harvey, M. S. (2024): Use of geometric morphometrics to distinguish trapdoor spider morphotypes (Mygalomorphae: Anamidae: Proshermacha): a useful tool for mygalomorph taxonomy. **The Journal of Arachnology** 52 (1): 31-40. <https://doi.org/10.1636/JoA-S-22-033>

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P. (1994): Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the entomological Society of America** 87 (6): 651-701. <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>

Sket, B. (2012): Diversity patterns in the Dinaric Karst. U: White, W. B., Culver, D. C. (ur.) Encyclopedia of caves. Amsterdam, Elsevier, str. 228-238.

Trontelj, P. (2018): Structure and Genetics of Cave Populations: Analysis and Synthesis. U: Moldovan, O. T., Kováč, L., Halse, S. (ur.) Cave Ecology. Cham, Springer, str. 269-295.

Therneau, T., Atkinson, B., Ripley, B. (2015): Package ‘rpart.’ <https://cran.r-project.org/web/packages/rpart/rpart.pdf>

Trivedi, S., Rehman, H., Saggu, S., Panneerselvam, C., Ghosh, S. K. (2020): DNA Barcoding and Molecular Phylogeny. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-50075-7>

Vrijenhoek, R. (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular marine biology and biotechnology** 3 (5): 294-9.

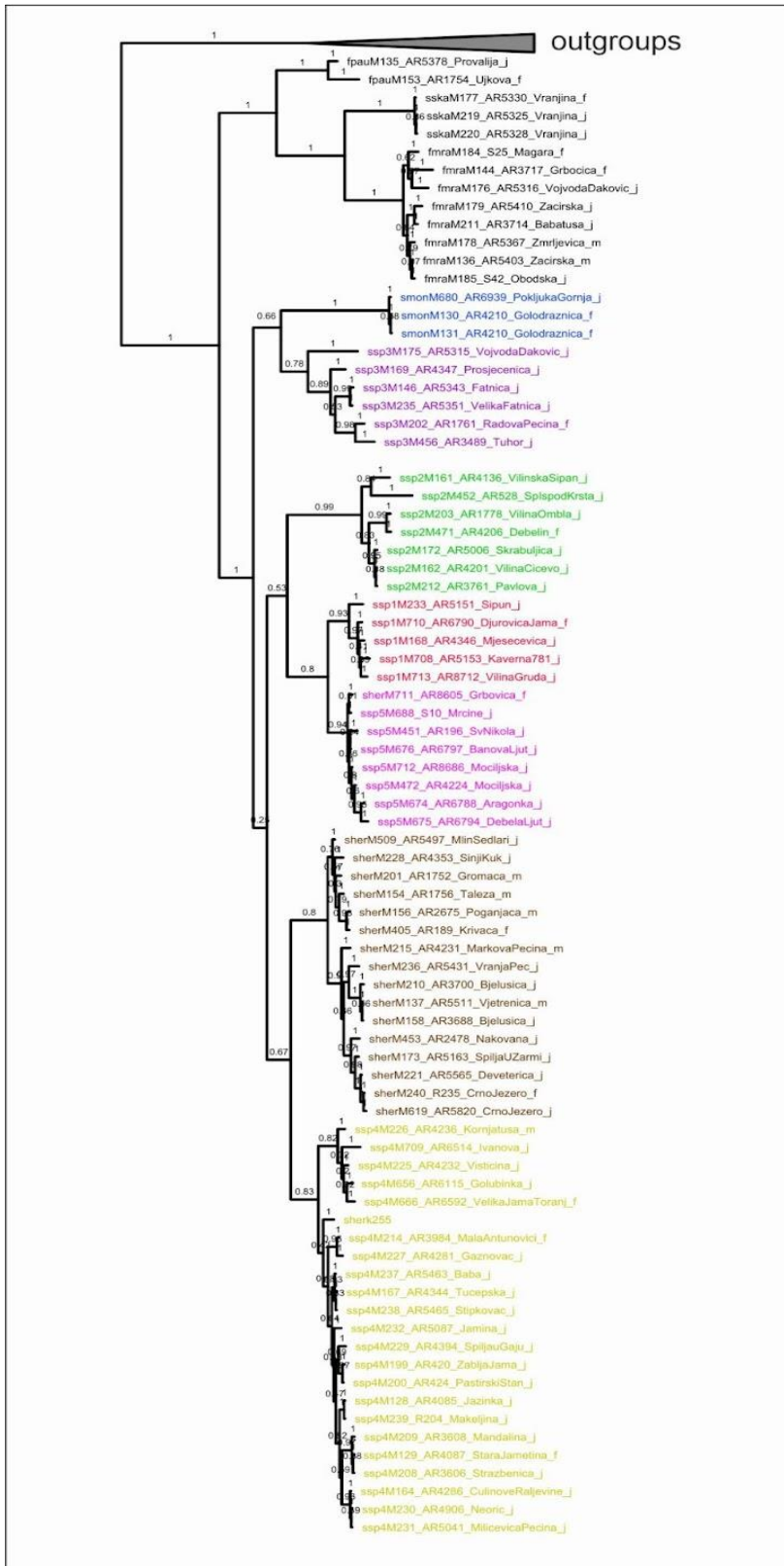
Wilson, J. D., Zapata, L. V., Barone, M. L., Cotoras, D. D., Poy, D., Ramírez, M. J. (2021): Geometric morphometrics reveal sister species in sympatry and a cline in genital morphology in a ghost spider genus. **Zoologica Scripta** 50 (4): 485-499. <https://doi.org/10.1111/zsc.12478>

Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., Stamatakis, A. (2013): A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics** 29 (22): 2869-2876. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499>

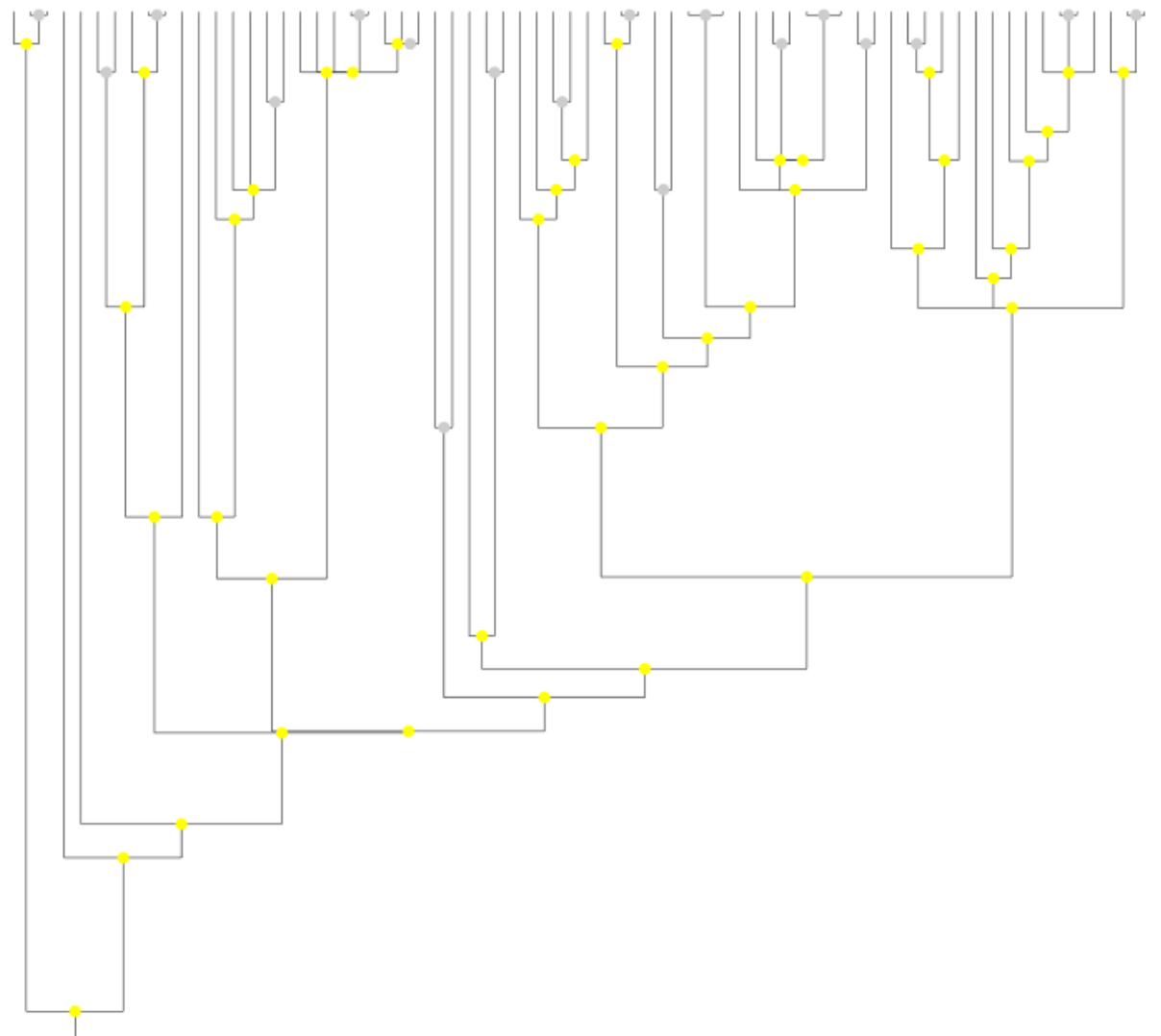
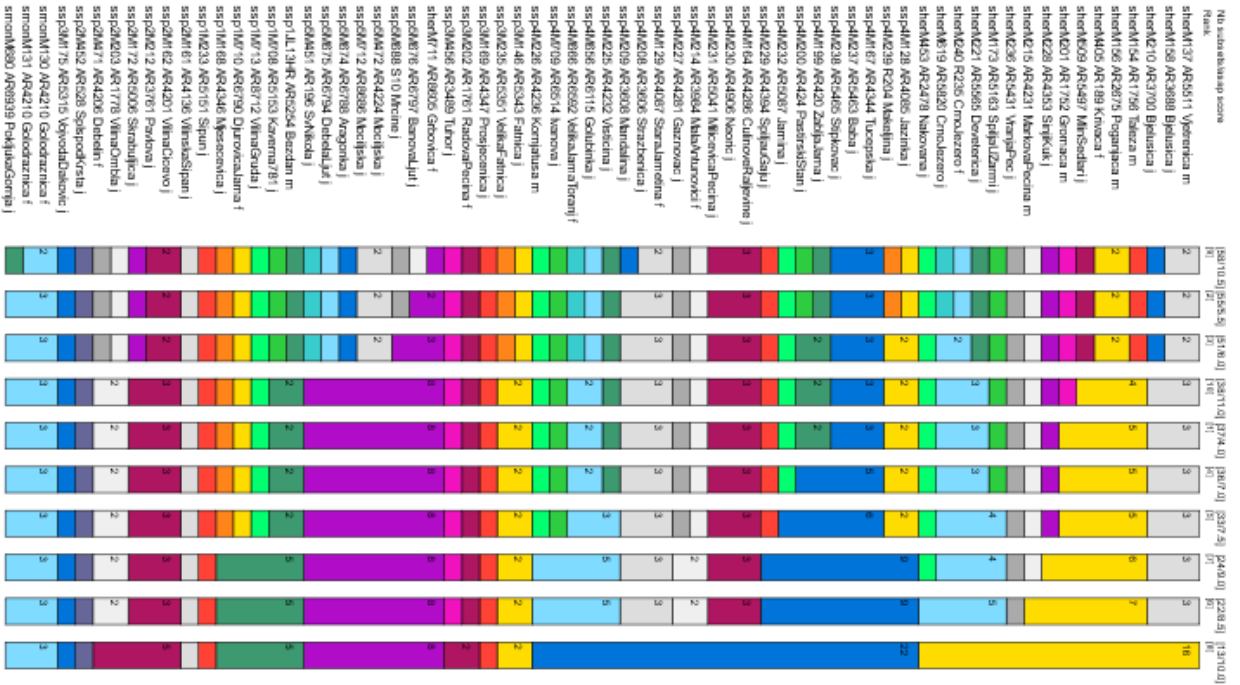
8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 2. rujna 2000. godine u Zagrebu. Završio sam V. gimnaziju u Zagrebu. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja sudjelovao sam na državnom Natjecanju iz biologije (2017) u kategoriji istraživačkih radova gdje sam osvojio drugo mjesto; te na Međunarodnoj konferenciji mladih znanstvenika (ICYS, 2018) gdje sam osvojio srebrnu medalju. Dobitnik sam nagrade Oskar znanja. Preddiplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu završio sam 2022. godine te sam iste godine upisao Diplomski studij Molekularne biologije. Tijekom studija sudjelovao sam u provedbi manifestacije Noć u muzeju u Prirodoslovnom muzeju u Zagrebu. Dobitnik sam Rektorove nagrade za istraživački rad koji je kasnije i objavljen pod naslovom: „Utilising public sequence databases to investigate genetic diversity of stoneflies in Medvednica Nature Park“. Rezultate tog rada prezentirao sam na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja (SiSB, 2022), Međunarodnoj konferenciji o DNA barkodiranju i bioraznolikosti (ICDBB, 2022) i Simpoziju europskih studenata biologije (SymBioSE, 2023). Od 2021. godine član sam Udruge studenata biologije – BIUS. Akademske godine 2023./2024. bio sam suvoditelj sekcije za pauke u BIUSu. Sudjelovao sam u provedbi istraživačko-edukacijskog projekta Histria 2022, Zagorje zelene 2023, Karin 2024 te u studentskim projektima Podzemlje Učke 2022 i Viridi Valle 2024. Član sam Hrvatskog biospeleološkog društva i Hrvatskog ekološkog društva. U sklopu Hrvatskog ekološkog društva sudjelovao sam u projektu Pauci i trčci Nacionalnog parka Plitvička jezera 2024. 2024. godine završio sam speleoškolu u udruzi Breganja i stekao zvanje Speleolog pripravnik. Od ostalih aktivnosti, član sam Šahovskog kluba Odra, a uz igranje šaha hobi mi je i vrtlarenje.

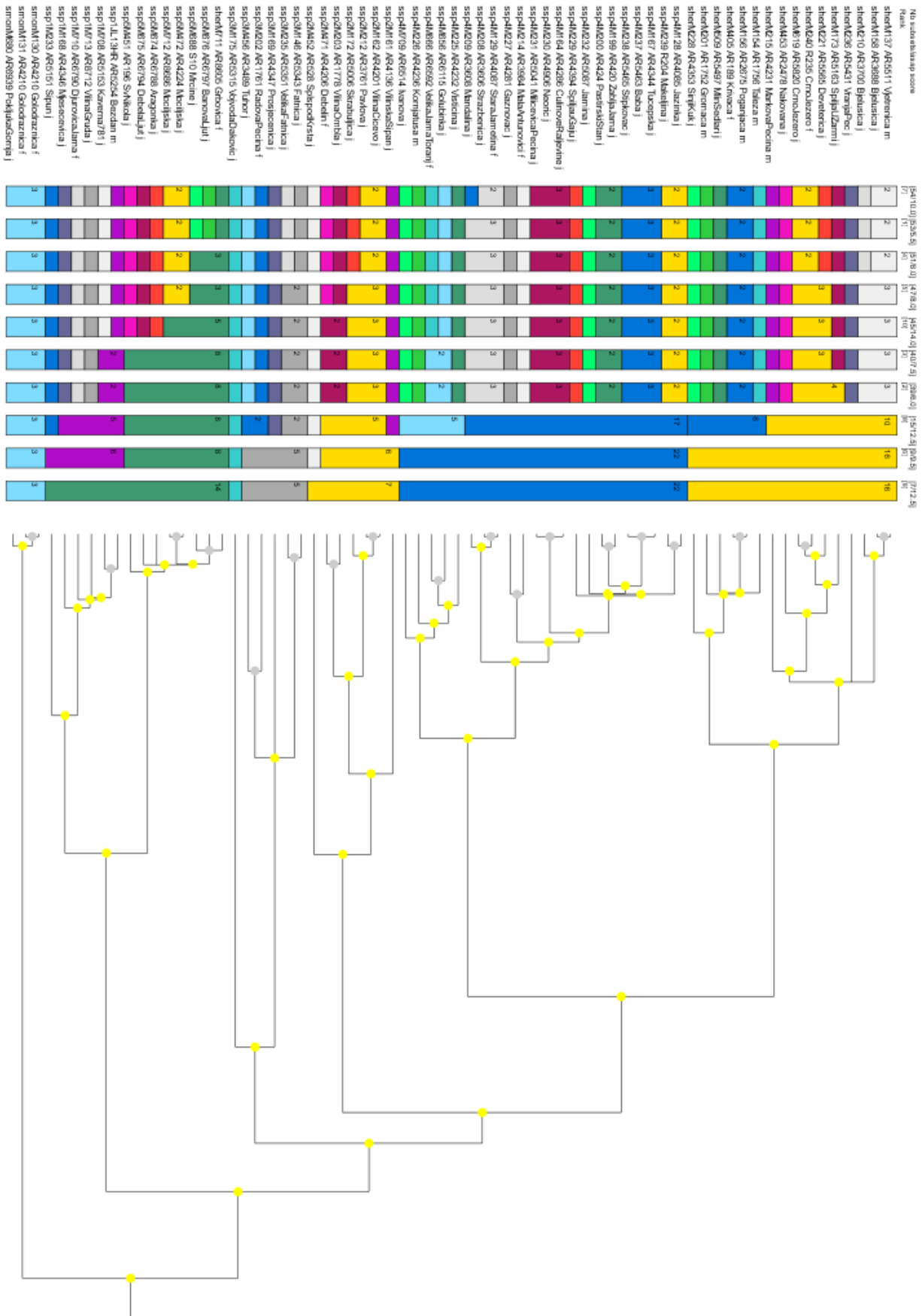
9. PRILOZI



Slika P1. MrBayes filogenetsko stablo dobiveno iz supermatriksa od 5 gena. Brojevi iznad grana označavaju njihovu podržanost: vrijednost 0,75 ili više označava podržane grane.



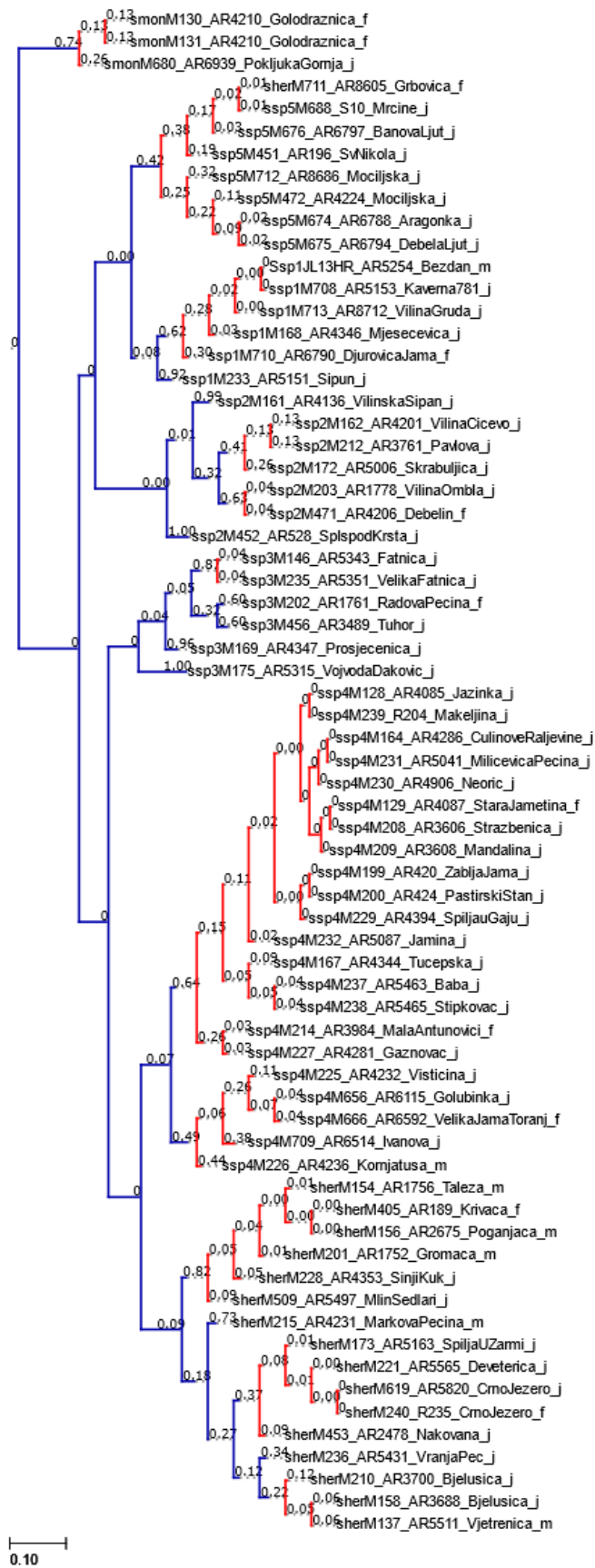
Slika P2. Rezultati ASAP Kimura 80 analize.



Slika P3. Rezultati ASAP *simple distance* analize.

Tablica P1. Rezultati ABGD Kimura 80 analize.

ABGD Kimura 80
<p>Initial Partition with prior maximal distance $P=7.74e-03$; Barcode gap distance = 0.029 Distance K80 Kimura MinSlope=1.000000</p> <p>Group[1] n: 16 ;id: sherM137 AR5511 Vjetrenica m sherM154 AR1756 Taleza m sherM156 AR2675 Poganjaca m sherM158 AR3688 Bjelusica j sherM173 AR5163 SpiljaUZarmi j sherM201 AR1752 Gromaca m sherM210 AR3700 Bjelusica j sherM215 AR4231 MarkovaPecina m sherM221 AR5565 Deveterica j sherM228 AR4353 SinjiKuk j sherM236 AR5431 VranjaPec j sherM240 R235 CrnoJezero f sherM405 AR189 Krivaca f sherM453 AR2478 Nakovana j sherM509 AR5497 MlinSedlari j sherM619 AR5820 CrnoJezero j</p> <p>Group[2] n: 8 ;id: sherM711 AR8605 Grbovica f ssp5M451 AR196 SvNikola j ssp5M472 AR4224 Mociljska j ssp5M674 AR6788 Aragonka j ssp5M675 AR6794 DebelaLjut j ssp5M676 AR6797 BanovaLjut j ssp5M688 S10 Mrcine j ssp5M712 AR8686 Mociljska j</p> <p>Group[3] n: 3 ;id: smonM130 AR4210 Golodraznica f smonM131 AR4210 Golodraznica f smonM680 AR6939 PokljukaGornja j</p> <p>Group[4] n: 6 ;id: ssp1JL13HR AR5254 Bezdani m ssp1M168 AR4346 Mjesecevic j ssp1M233 AR5151 Sipun j ssp1M708 AR5153 Kaverna781 j ssp1M710 AR6790 DjurovicaJama f ssp1M713 AR8712 VilinaGruda j</p> <p>Group[5] n: 6 ;id: ssp2M161 AR4136 VilinskaSipan j ssp2M162 AR4201 VilinaCicevo j ssp2M172 AR5006 Skrabaljica j ssp2M203 AR1778 VilinaOmbla j ssp2M212 AR3761 Pavlova j ssp2M471 AR4206 Debelin f</p> <p>Group[6] n: 1 ;id: ssp2M452 AR528 SpIspodKrsta j</p> <p>Group[7] n: 2 ;id: ssp3M146 AR5343 Fatnica j ssp3M235 AR5351 VelikaFatnica j</p> <p>Group[8] n: 1 ;id: ssp3M169 AR4347 Prosjecenica j</p> <p>Group[9] n: 1 ;id: ssp3M175 AR5315 VojvodaDakovic j</p> <p>Group[10] n: 2 ;id: ssp3M202 AR1761 RadovaPecina f ssp3M456 AR3489 Tuhor j</p> <p>Group[11] n: 22 ;id: ssp4M128 AR4085 Jazinka j ssp4M129 AR4087 StaraJametina f ssp4M164 AR4286 CulinoveRaljevine j ssp4M167 AR4344 Tucepska j ssp4M199 AR420 ZabljaJama j ssp4M200 AR424 PastirskiStan j ssp4M208 AR3606 Strazbenica j ssp4M209 AR3608 Mandalina j ssp4M214 AR3984 MalaAntunovici f ssp4M225 AR4232 Visticina j ssp4M226 AR4236 Kornjatasa m ssp4M227 AR4281 Gaznovac j ssp4M229 AR4394 SpiljauGaju j ssp4M230 AR4906 Neoric j ssp4M231 AR5041 MilicevicPecina j ssp4M232 AR5087 Jamina j ssp4M237 AR5463 Baba j ssp4M238 AR5465 Stipkovac j ssp4M239 R204 Makeljina j ssp4M656 AR6115 Golubinka j ssp4M666 AR6592 VelikaJamaToranj f ssp4M709 AR6514 Ivanova j</p>



Slika P4. Rezultati bPTP *MrBayes* analize.