

Špela Gorički¹

Razširjenost, evolucija in raznolikost populacij človeške ribice (*Proteus anguinus*)

POVZETEK

Sorodstveni odnosi med populacijami človeške ribice so bili dolgo neznanka. Njeno evlucijsko zgodovino smo ugotavljali s filogenetsko analizo zaporedij mitohondrijskih genov. Z uporabo molekulske ure smo približno ocenili čase ločitev evlucijskih linij. Cepitve med tremi največjimi kladi, iz (1) Istre, (2) Slovenije in (3) osrednjih Dinaridov ter Dalmacije in Hercegovine so se po naših ocenah zgodile pred približno 7,2–16 milijoni let. Klada (2) in (3) sta naprej deljena. Edinstvena pigmentirana rasa človeške ribice iz Bele krajine je del jugovzhodnoslovenskega klada. Glede na recipročno monofilijo geografsko ali hidrografsko ločenih kladov in visoke genetske razdalje, ki dosegaajo ali presegajo genetske razdalje med sestrskimi vrstami drugih dvoživk, smo identificirali več domnevno samostojnih evlucijskih linij, oziroma različnih vrst človeške ribice. Tudi pigmentirana človeška ribica verjetno predstavlja samostojno vrsto kljub temu, da smo pri tej populaciji zaznali precejšnjo genetsko podobnost s sorodnimi belimi človeškimi ribicami. Z inovativno metodo detekcije okoljske DNA (eDNA) v podzemni vodi smo namreč ugotovili, da se areala črne in bele človeške ribice v Beli krajini stikata. Ker pa doslej njunih križancev nismo zaznali ne z genetskimi ne z morfološkimi metodami, domnevamo, da sta populaciji reproduktivno izolirani, kar ustreza klasičnemu biološkemu konceptu vrste. Metodo okoljske DNA človeške ribice smo uspešno uporabili tudi v izviri Črne Gore, zunaj doslej znanega območja njene razširjenosti, kar predstavlja prvo rabo te metode na kateri koli jamski živali na svetu.

Ključne besede: človeška ribica, evolucija, eDNA, Dinarski kras.

Voda v prevotljenem apnencu nudi domovanje številnim specializiranim živim bitjem. Zagotovo najbolj znamenita prebivalka kraških podzemnih voda je človeška ribica. To je edina v Evropi živeča dvoživka (sorodnica pupkov, močeradov, žab in krastač), ki je prilagojena življenju v podzemlju. Od njenega uradnega znanstvenega poimenovanja pred 251 leti (Laurenti, 1768) do danes so človeško ribico opazili na skoraj 300 nahajališčih – ponavadi v jamah in izviri – vzdolž Dinarskega krasa med Sočo v Italiji in Trebišnjico v Hercegovini. Izčrpen pregled 250 let raziskav človeške ribice podaja Aljančič (2019).

Vendar kraške vode niso povezane v neprekinjen podzemni splet, ampak zaradi netopnih kamninskih zaplat deloma tečejo po površju. Skozi geološko zgodovino se je območje današnjega Dinarskega krasa predvsem zaradi tektonskih premikov in klimatskih dejavnikov zelo spreminjalo, in to se dogaja še danes. Tudi nadzemni in podzemni vodni preplet se stalno spreminjata: ponekod se prej ločene vode sčasoma ali nenadno zlijejo, drugje spet presahnejo. Takšne hidrografske spremembe lahko prekinajo stik med prej prostorsko povezanimi osebki iste vrste. Vsaka od teh populacij se posled spreminja in razvija povsem

ločeno od drugih. Če so povezave med populacijami prekinjene dovolj dolgo, se iz prej enotne vrste lahko razvije več novih. Osebki tako nastalih različnih vrst se ob morebitnem ponovnem stiku navzkrižno razmnožujejo le zares izjemoma.

Evlucijska zgodovina vsakega organizma se odraža v njegovih dednih lastnostih (morfologiji, vedenju, zaporedju DNA itd.). Pri preučevanju in klasifikaciji takih vrst, katerih razmnoževanja v naravi ni mogoče opazovati, laboratorijski poskusi pa bi trajali predolgo, si zato pomagamo z analiziranjem njihovih dednih lastnosti. Velika podobnost dveh ali več osebkov v neki lastnosti je lahko odraz njihovega bližnjega sorodstva in nedavnega skupnega prednika ali pa, nasprotno, podobnih življenjskih pogojev, v katerih so se izmed nekoč različnih nesorodnih pojavnih oblik ohranile le take z določenimi lastnostmi. V primerjavi z genetskimi znaki je lahko vpliv okolja na morfološke lastnosti izrazitejši in pogostejši. Pod vplivom enako usmerjene selekcije lahko prihaja do konvergenč, to je do podobnih izpeljanih morfoloških stanj, ki izvirajo iz med seboj različnih predniških stanj (vendar konvergenca niso nujno adaptivnega značaja). Ta pojav nas torej lahko zavede v prepričanju, da so si med seboj podobni organizmi tudi neposredno sorodni, kar pa ni nujno res. Tudi pri človeški ribici je povsem mogoče, da populacije, ki naseljujejo med seboj ločena porečja, ali ki so med seboj oddaljene nekaj

¹ Scriptorium biologorum – Biološka pisarna, znanstvene raziskave in razvoj, d.o.o., Ulica Nikole Tesla 6, 9000 Murska Sobota, e-mail: goricki.spela@gmail.com

sto kilometrov, pravzaprav sorodstveno niso tako tesno povezane, kot domnevamo glede na njihov podoben izgled.

Kot kaže, nas je človeška ribica glede tega vprašanja dolgo časa slepila, in sicer vsaj odkar je Leopold Fitzinger leta 1850 pod rodovnim imenom *Hypochthon* na osnovi morfoloških razlik med tedaj znanimi populacijami človeško ribico razdelil na sedem vrst. Sodobniki Fitzingerjeve členitve niso sprejeli. Ob tem je treba tudi poudariti, da se je v sredini 19. stoletja človeštvo šele začelo zavedati dolgega Zemljinega obstoja in počasnega geološkega in klimatskega spreminjanja zemeljskega površja (1830), niso vedeli za tektonske premike zemeljske skorje (sredina 20. stoletja) in niso poznali ne evolucije (Darwinova knjiga o izvoru vrst je izšla 1859) ne principov dedovanja (Mendlove ugotovitve objavljene 1865, vendar povsem neznane do začetka 20. stoletja) in ne DNA (prvič so jo izolirali 1869, kot nosilko dednega zapisa pa identificirali šele 1943). Verjeli so, da so tako vrste kot tudi višje biološke skupine fiksne, produkt enkratnega nastanka nekoč v preteklosti. Medtem ko Fitzingerjeve ugotovitve niso bile statistično ovrednotene (začetek biometrije sega v zgodnje 20. stoletje), pa v nobeni od novejših analiz raziskovalci na osnovi morfologije niso uspeli zbrati dovolj trdnih dokazov, da bi človeško ribico lahko razdelili na več vrst.

Odkritje črne človeške ribice v Beli krajini leta 1986 (Aljančič in sod., 1986) je sprožilo serijo multivariatnih biometričnih obdelav te in belih človeških ribic iz različnih koncev areala (območja razširjenosti; Sket in Arntzen, 1994; Grillitsch in Tiedemann, 1994; Arntzen in Sket, 1997; Ivanović in sod., 2013). Domnevamo, da je črna človeška ribica, ki po svojem izgledu izrazito odstopa od drugih populacij, podobna izumrlemu skupnemu predniku človeških ribic iz evolucijske preteklosti, ko te še niso naselile podzemlja in postale troglomorfne. Na osnovi izrazitih razlik v morfologiji sta Boris Sket in Jan Arntzen leta 1994 razdelila človeško ribico na dve podvrsti: *Proteus anguinus anguinus* (bela človeška ribica) in *Proteus anguinus parkelj* (črna človeška ribica). Ta delitev je v veljavi še danes.

Omenjeno analizo je spremljala opredelitev ozko sorodnih encimov (alocimov) v nekaterih slovenskih populacijah, s pomočjo katere sta raziskovalca skušala ugotoviti genetsko strukturo vrste. V primerjavi vzorcev podobnosti alocimov in morfologije sta prvič pri človeški ribici nakazala, da so nekatere hidrografske izolirane populacije, ki so si v splošnih troglomorfnih znakih med seboj zelo podobne, genetsko pravzaprav precej različne. Verjetno je bil genski pretok med temi populacijami prekinjen že v površinskih vodah, pred vselitvijo v podzemlje, morfološka podobnost pa bi lahko bila rezultat konvergentne evolucije.

Problematico znotrajvrstnih odnosov, kjer so morfološke razlike večinoma zelo majhne, lahko bolj zanesljivo razjasnimo z uporabo molekulskih znakov. Ena od molekularno genetskih metod, ki nam to omogoča, je analiza informacij v zaporedju mitohondrijske DNA (mtDNA). MtDNA je v primerjavi z jedrnim geni klonalno dedovana po materini liniji in je zato brez

rekombinacij, a ima visoko stopnjo mutabilnosti (pojavljanja mutacij). Zaradi hitre evolucije določenih delov mitohondrijskega genoma in enostarševskega dedovanja lahko za ugotavljanje sorodstvenih odnosov na ravni populacij uporabimo mtDNA v kombinaciji z metodami, ki temeljijo na filogenetskih konceptih. Pri tem upoštevamo le značilnosti, za katere ugotovimo, da so izpeljane (apomorfije), za izvorna stanja (pleziomorfije) pa velja, da ne nosijo v te namene nobene uporabne informacije. Na ta način sva s Petrom Trontljem na Oddelku za biologijo Univerze v Ljubljani pred nekaj leti preučevala sorodstvene odnose med populacijami človeške ribice s celotnega območja njene takrat znane razširjenosti (Gorički, 2006; Gorički in Trontelj, 2006; Trontelj in sod., 2007; Trontelj in sod., 2009). V ta namen sva zbrala podatke o zaporedju nekaj manj kot četrt dolžine mtDNA pri skoraj 180 primerkih človeške ribice.

Z analizami mtDNA sva potrdila in nadgradila, kar so nakazali že alocimi: izračunala sva, da so nekatere populacije človeške ribice med seboj ločene že več milijonov let (Slika 1); domnevamo, da so podzemlje naselile ločeno in neodvisno ena od druge. Bazalna ločitev na tri klade (Istra, Slovenija-Italija in Dalmacija-Hercegovina-Bosanska Krajina) bi se naj po naših ocenah bila zgodila pred približno 16 do 8,8 milijoni let. Vzrok cepitve teh linij bi lahko bile miocenske morske transgresije, ki bi predniku teh kladov predstavljale migracijsko bariero. Vse od karpatske do zgodnje-badenijske (17,3–14 milij. let) transgresije naj bi namreč morje pokrivalo območje osrednje Slovenije (Rögl, 1998), Istra pa bi lahko bila ločena od kontinenta. Zadnja miocenska morska transgresija naj bi po Paveliću (2002) to območje poplavlila pred 13,4 milijoni let. Tako v slovenskem kot v južnodinarskem kladu je po naših približnih ocenah do nadaljnjih cepitev prišlo pred 5,4–4,2 milijonoma let. Cepitve med liško, bosansko in dalmatinsko-hercegovsko skupino bi se lahko bile zgodile v dokaj kratkih časovnih presledkih ali celo istočasno. Časi ločitev teh treh glavnih evolucijskih linij s tega območja sovpadajo z domnevnim obstojem nepovezanih jezer v mesiniju, pribl. 6 do 5,5 milijonov let nazaj (Prelogović in sod., 1975), v katerih bi se te linije lahko ločile. Konec miocena naj bi tudi v južni Sloveniji tektonska aktivnost povzročila nastanek ločenih jezerskih kotanj (Prelogović in sod., 1975), kjer bi lahko prišlo do diferenciacije prednikov današnjega jugovzhodnega (Stična, Dolenjska, Bela krajina) in jugozahodnega (Pivka, Ljubljana, Kras) klada. Stiška linija naj bi se od drugih populacij jugovzhodne Slovenije ločila pred vsaj približno 3,6–2,9 milijoni let, to pa sega že v obdobje, ko so se v severnem delu Dinarskega krasa postopoma formirale prve vodne jame primerne za naselitev jamskih vrst, ki jih poznamo danes (Mihevc, 2007). Znotraj omenjenih samostojnih evolucijskih linij človeške ribice se nadaljnja, novejša genetska členitev v veliki meri, a ne povsem, ujema z današnjo hidrografske razmejitvijo njihovih arealov. V primerih odstopanj genetski podatki morda nakazujejo na njihovo nepopolno hidrografske razmejitve (Habič, 1989) in obstoječ genski pretok ali neodvisne poti kolonizacije dveh porečij iz homogene izvirne populacije (ohranitev predniških alelov), nasprotno pa ponekod v hidrografske povezanih območjih verjetno prihaja do izolacije z razdaljo. Veliko slabše pa je ujemanje genetske strukture z

morfologijo (in torej tudi s Fitzingerjevo členitvijo na vrste), čeprav je nekatere od teh skupin vendarle možno dokaj dobro razlikovati na osnovi zapletene kombinacije znakov, kot so število in razporeditev zob, število repnih vretenec in drugih.

Če stopnje divergence med imenovanimi sestrskimi kladi človeške ribice primerjamo z razlikami v zaporedju mtDNA nekaterih sestrskih vrst repatih dvoživk, ugotovimo, da bi te populacije lahko predstavljale različne vrste, te pa so združene morda celo v različne rodove. Analiza mitohondrijskega genoma pa ima nekaj pomanjkljivosti, zato je, kot je tudi sicer normativ v znanosti, treba te ugotovitve preveriti še z dodatnimi, neodvisnimi pristopi. Danes so na voljo laboratorijske in bioinformacijske tehnologije, ki omogočajo analizo veliko večjega segmenta genskega zapisa, vključno z jedrno DNA, ki pa je pri človeški ribici izredno velika in zapletena (njena skupna dolžina je skoraj 50 Gbp, kar je 15-krat več od človeškega genoma in je eden največjih genomov katerega koli organizma na Zemlji). Ta problem je nedavno uspešno zaobšla mednarodna skupina raziskovalcev (Vörös in sod., 2019) z analizo jedrnih mikrosatelitnih lokusov, to je kratkih ponavljajočih se zaporedij DNA, pri katerih primerjamo število zaporednih ponovitev med osebkami in med populacijami. S to metodo so analizirali vzorce iz treh geografskih območij na Hrvaškem (Istra, Lika in Dalmacija) ter potrdili globoko genetsko členjenost človeške ribice, ki smo jo ugotovili v analizah mtDNA. Zelo razveseljav je tudi podatek, da se ocena časa bazalne cepitve na osnovi analize mikrosatelitov (18,2-7,2 milij. let) povsem ujema z našo oceno na osnovi mtDNA. Upamo, da bodo rezultati analiz preostalih populacij tudi kmalu na voljo.

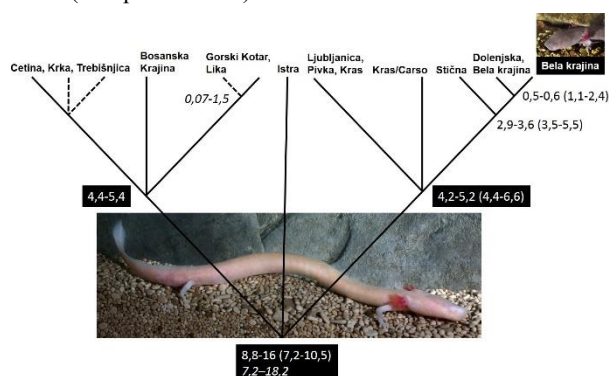
Če si sedaj podrobneje ogledamo najmlajše cepitve evolucijskega drevesa človeške ribice, je najbolj nenavaden položaj črne rase iz Bele krajine. Cepitev črne in bele oblike dolenjskobelokranjske genetske skupine bi se lahko po ocenah hitrosti evolucije mtDNA bila zgodila šele pred kake 500.000 leti, čeprav je možno, da sega celo do 2,4 milijona let nazaj. Starejša, predpleistocenska datacija se ujema z domnevnim začetkom zakrasevanja na tem območju (Radinja, 1972). Začetek zakrasevanja bi lahko vodil do genetske izolacije črne in bele belokranjske populacije zaradi morebitnega časovno in prostorsko ločenega vseljevanja v podzemlje (Sket in Arntzen, 1994). Kljub vsem dosedanjim raziskavam črne človeške ribice (Bizjak-Mali in Sket, 2019) pa še vedno ne znamo razložiti, zakaj in kako je črna človeška ribica ohranila svojo predniško obliko, saj je po načinu življenja povsem troglobiontska (vezana na podzemlje), tako kot vse njene bele sorodnice. V tem smislu si veliko obetamo od primerjalnih analiz genoma in transkriptoma (funkcionalnih molekul RNA) različnih populacij.

Ugotovitev, da tudi ta izjemno redka in na videz zelo posebna človeška ribica predstavlja samostojno vrsto velja kljub temu, da smo pri tej populaciji zaznali precejšnjo genetsko podobnost s sorodnimi belimi človeškimi ribicami. Pot do tega odkritja se nam je odprla leta 2008, ko so varstveni biologi prvič uspešno uporabili forenzično metodo detekcije DNA v okolju pri recentnem (danes živečem) vodnem vretenčarju, invazivni volovski žabi (Ficetola in sod., 2008).

Leta 2012 smo na pobudo Gregorja Aljančiča iz Jamskega laboratorija Tular v Kranju začeli razvijati metodo detekcije DNA človeške ribice, ki jo ta, kjer je navzoča, oddaja v okolje (Aljančič in sod., 2014a,b; Stanković in sod., 2016; Gorički in sod., 2016, 2017). Pri tem smo veliko dela opravili prostovoljno. Metoda je še posebej primerna ravno za ugotavljanje razširjenosti vrst, ki so zelo redke ali živijo v človeku nedostopnem podzemlju. Na ta način je kolega David Stanković s sodelavci v vzorcih jamske in izvirske vode v Črni Gori nakazal na možnost, da človeška ribica naseljuje tudi kraško podzemlje te države. Potrditev DNA človeške ribice v izvrih Črne Gore, torej možnost obstoja povsem neznanih populacij zunaj doslej znanega območja razširjenosti, predstavlja prvo rabo metode detekcije okoljske DNA (eDNA) na kateri koli jamski živali na svetu. Opogumljeni s tem uspehom smo analizirali še ducat izvirov, vodnjakov in vodnih jam v Beli krajini ter ugotovili, da se areala črnih in belih človeških ribic tam stikata. To pomeni, da osebkami črne in bele populacije preko občasnih podzemnih hidrografskih povezav (Habič in sod., 1990) potencialno prihajajo v stik drug z drugim. Ker pa doslej njihovih križancev nismo zaznali ne z genetskimi ne z morfološkimi metodami, domnevamo, da sta populaciji reproduktivno izolirani, kar ustreza klasičnemu biološkemu konceptu vrste.

S temi pionirskimi raziskavami v svetovnem merilu (Culver in Pipan, 2019) smo, upamo, dostojno obeležili 250-to obletnico znanstvenega opisa človeške ribice (1768) in hkrati 30-to obletnico odkritja črne človeške ribice (1986). Slovenija v svetu velja za zibelko speleobiologije (jamske biologije): človeška ribica iz Slovenije je bila prva znanstveno opisana jamska žival na svetu. Tehnologija eDNA, ki jo v lastnem podjetju v sodelovanju s partnerskimi podjetji in inštituti razvijam še naprej (Gorički in sod., 2018), omogoča decentralizacijo raziskav človeške ribice in enakovredno vključitev nekraškega Pomurja v mednarodni znanstveni ugled Slovenije na področju speleobiologije. Naše analize pomembno prispevajo k izboljšanju razumevanja poteka evolucijskih dogodkov na Dinarskem krasu in današnje razširjenosti človeške ribice, žal pa se jih še vedno ustrezno ne upošteva pri njenem varstvu in ohranjanju njenega habitata.

Uvodni del tega prispevka je objavljen na <https://www.esticna.si/narava/cloveska-ribica/>: Posebnosti človeške ribice iz Stične (dr. Špela Gorički)



Slika 1: Rekonstrukcija sorodstvenih odnosov med populacijami človeške ribice in približne ocene časa ločitev linij (v milijonih let) na osnovi molekulske ure mitohondrijske DNA (Gorički, 2004; Gorički, 2006) in mikrosatelitnih lokusov jedrne DNA (Vörös, 2019; v kurzivu). Cepitve izpisane na črni podlagi so se najverjetneje zgodile v površinskih vodah, pred vselitvijo v podzemlje, ko je človeška ribica izgledala podobno kot današnja pigmentirana populacija iz Bele krajine (zgoraj desno). Vse ostale danes znane populacije človeške ribice so troglomorfne (depigmentirane in slepe). S črtkano črto je označena manj izrazita ali zanesljiva genetska diferenciacija. Foto: Gregor Aljančič, Jamski Laboratorij Tular, Kranj

Viri

Aljančič G., Năpăruș-Aljančič M., Stanković D., Pavićević M., Gorički Š., Kuntner M. in Merzlyakov L. 2014a. A survey of the distribution of *Proteus anguinus* by environmental DNA sampling. CEPF Final Project Completion Report, Kranj: Society for Cave Biology, 30 str.

Aljančič, G., Gorički, Š., Năpăruș, M., Stanković, D. in Kuntner, M. 2014b. Endangered *Proteus*: combining DNA and GIS analyses for its conservation. V: P. Sackl, R. Durst, D. Kotrošan in B. Stumberger (ur.), Dinaric Karst Poljes - Floods for Life. Radolfzell: EuroNatur, 70-75.

Aljančič, G. 2019. History of research on *Proteus anguinus* Laurenti 1768 in Slovenia. *Folia Biologica et Geologica* 60, 39-69.

Aljančič, M., Habič, P. in Mihevc, A. 1986. Črni močeril iz Bele krajine. *Naše jame* 28, 39-44.

Arntzen, J. W. in Sket, B. 1997. Morphometric analysis of black and white European cave salamanders, *Proteus anguinus*. *Journal of Zoology (London)* 241, 699-707.

Bizjak-Mali, L. in Sket, B. 2019. History and biology of the »black proteus« (*Proteus anguinus* parkelj Sket & Arntzen 1994; Amphibia: Proteidae): a review. *Folia Biologica et Geologica* 60, 5-37.

Culver D. C., in Pipan T. 2019. The biology of caves and other subterranean habitats. Oxford: Oxford University Press, 301 str.

Ficetola, G.F, Miaud, C., Pompanon, F. and Taberlet, P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4, 423-425.

Fitzinger, L. 1850. Über den *Proteus anguinus* der Autoren. Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften 5, 291-303.

Laurenti, J. N. 1768. Specimen medicum, exhibens synopsis reptilium emendatam cum experimentis circa venena et antidota reptilium Austriacorum. Viennæ: Trattner, 214 str.

Gorički, Š. 2004. Ugotavljanje genetske diferenciacije močerila (*Proteus anguinus*) z analizo zaporedij mitohondrijske DNA. Magistrsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 63 str.

Gorički, Š. 2006. Filogeografska in morfološka analiza populacij močerila (*Proteus anguinus*). Doktorska disertacija, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 76 str.

Gorički, Š. in Trontelj, P. 2006. Structure and evolution of the mitochondrial control region and flanking sequences in the European cave salamander *Proteus anguinus*. *Gene* 378, 31-41.

Gorički, Š., Stanković, D., Năpăruș-Aljančič, M., Snoj, A., Kuntner, M., Gredar, T., Vodnik, L. in Aljančič, G. 2016. Searching for the black *Proteus* with the help of eDNA. *Natura Sloveniae* 18, 57-58.

Gorički, Š., Stanković, D., Snoj, A., Kuntner, M., Jeffery, W. R., Trontelj, P., Pavićević, M., Grizelj, Z., Năpăruș-Aljančič, M. and Aljančič, G. 2017. Environmental DNA in subterranean biology: range extension and taxonomic implications for *Proteus*. *Scientific Reports* 7, 45054.

Gorički Š., Presetnik P., Prosenc-Zmrzljak U., Gredar T., Blatnik M., Kogovšek B., Koit O., Mayaud C., Strah S., Jalžić B., Aljančič G., Štebih, D., Hudoklin A. in Košir R. 2018. Development of eDNA methods for monitoring two stygobiotic species of the Dinaric Karst, *Proteus anguinus* and *Congerina jalcici*, using digital PCR. *Natura Sloveniae* 20, 47-50.

Grillitsch, H. in Tiedemann, F. 1994. Die Grottenolm-Typen Leopold FITZINGERS (Caudata: Proteidae: Proteus). *Herpetozoa* 7, 139-148.

Habič, P. 1989. Kraška bifurkacija Pivke na jadransko črnemorskem razvodju. *Acta Carsologica* 18, 233-264.

Habič, P., Kogovšek, J., Bricelj, M. & Zupan, M. 1990. Izviri Dobličice in njihovo širše kraško zaledje. *Acta Carsologica* 19, 5-100.

Ivanović, A., Aljančič, G. & Arntzen, J.W., 2013: Skull shape differentiation of black and white olms (*Proteus anguinus* anguinus and *Proteus a. parkelj*): an exploratory analysis with micro-CT scanning. *Contributions to Zoology* 82, 107-114.

Mihevc, A. 2007. The age of Karst relief in west Slovenia. *Time in Karst (Postojna)*, 35-44.

Pavelić, D. 2002. The south-western boundary of Central Paratethys. *Geologia Croatica* 55, 83-92.

Prelogović, E., Arsovski, M., Kranjec, V., Radulović, V., Sikošek, B. in Soklič, S. 1975. Paleogeografska evolucija teritorije Jugoslavije od terciara do danas. *Acta seismologica iugoslavica* 2-3, 7-11.

Radinja, D. 1972. Zakrasevanje v Sloveniji v luči celotnega morfogenetskega razvoja. Geografski zbornik 13, 199-242.

Rögl, F., 1998. Palaeogeographic considerations for Mediterranean and Paratethys seaways (Oligocene to Miocene). Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien 99A, 279-310.

Sket, B. in Arntzen, J. W. 1994. A black, non-troglophobic amphibian from the karst of Slovenia: *Proteus anguinus parkelj* n. ssp. (Urodela: Proteidae). Contributions to Zoology 64, 33-53.

Stanković, D., Gorički, Š., Năpăruș-Aljančič, M., Snoj, A., Kuntner, M. in Aljančič, G. 2016. Application of environmental DNA for detection of *Proteus*. Natura Sloveniae 18, 55-56.

Trontelj, P., Gorički, Š., Polak, S., Verovnik, R., Zakšek, V. in Sket, B. 2007. Age estimates for some subterranean taxa and lineages in the Dinaric Karst. Acta Carsologica 36, 183-189.

Trontelj, P., Douady, C. J., Fišer, C., Gibert, J., Gorički, Š., Lefébure, T., Sket, B. in Zakšek, V. 2009. A molecular test for cryptic diversity in ground water: how large are the ranges of macro-stygobionts? Freshwater Biology 54, 727-744.

Vörös, J., Ursenbacher, S. in Jelić, D. 2019. Population genetic analyses using 10 new polymorphic microsatellite loci confirms genetic subdivision within the olm, *Proteus anguinus*. Journal of Heredity 110, 211-218.