



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ДЕПАРТМАН ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



**Генетички диверзитет *Merodon ruficornis* групе
(Diptera: Syrphidae)**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор:
Проф. др Михајла Ђан
др Љиљана Шашић Зорић

Кандидат:
Ива Горше

Нови Сад, 2024. године

За Вању...

Захвала

Неизмерну захвалност дугујем својим менторкама, редовној професорици др Михајли Ђан и др Љиљани Шашић Зорић на свесрдној подрици, саветима и поверењу указаном током израде ове докторске дисертације. Хвала што сте своје знање несебично делиле са мном и подстицале ме да се успињем лествицама науке. Биле су и остаће моја инспирација. Изузетну захвалност дугујем менторки др Михајли Ђан на свим могућностима које ми је пружила, као и на указаном поверењу и жељи да ме прихвати као део свог тима. Својим знањем и енергијом је у мени пробудила и неговала љубав ка генетици. Менторки др Љиљани Шашић дугујем огромну захвалност што је на мене пренела љубав ка молекуларној таксономији и указала ми изузетно поверење и част да у свом научном путу наставим њеним стопама. Хвала на свему што ме је научила и отворила врата даљег напретка.

Најискреније се захваљујем редовном професору др Антеу Вујићу на помном праћењу мог научног развоја, неизмерној подрици и свим саветима који су оставили неизбрисив траг у мом истраживачком раду. Изузетна част и задовољство је сарађивати са великим научником и добрим човеком. Хвала што ми је указао да истраживање започиње изван зидова лабораторије.

Велику захвалност дугујем др Сањи Веселић и др Слободану Давидовићу на конструктивним сугестијама и коментарима. Својим саветима су допринели побољшању квалитета ове докторске дисертације.

Посебно се захваљујем др Марији Миличић на заједничком раду, указаној помоћи и корисним саветима током истраживања.

Велику захвалност дугујем својим драгим колегама из Лабораторије за генетику, Департамана за биологију и екологију на лепој енергији и дружењу. Посебно се захваљујем др Наташи Кочић Тубић на првим лабораторијским корацима још током студентских дана, као и на пруженим саветима. Хвала др Миломиру Стефановићу на помоћи и пренетом знању.

Захваљујем се Ивани Матић на заједничком раду, као и несебичној подрици и пријатељству које ми је пружила. Хвала Цвијети Лазић на разумевању и речима подршке.

Драгој колегиници и пријатељу Маји Оберман се захваљујем на заједничким моментима и енергији којом је улепшавала сваки дан, јер без ње не би било исто.

Захвалност на прикупљеном материјалу, као и дружењу током теренских истраживања дугујем члановима Лабораторије за истраживање и заштиту биодиверзитета, Департамана за биологију и екологију.

Пријатељима Марини, Лазару, Владану и Григорију се захваљујем на подршци и разумевању које ми безрезервно пружају свих ових година.

Највећу захвалност дугујем својој породици на несебичној љубави и пожртвованости. Хвала на ослоњу и ветру у леђа.

Гаврилу хвала за љубав и подршку којом ме је оснаживао када је било најпотребније.

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Ива Горше
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција):	др Михајла Ђан, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду др Љиљана Шашић Зорић, научни сарадник, Институт Биосенс – Истраживачко-развојни институт за информационе технологије биосистема, Универзитет у Новом Саду
Наслов рада:	Генетички диверзитет <i>Merodon ruficornis</i> групе (Diptera: Syrphidae)
Језик и писмо рада:	Српски језик, ћирилица
Физички опис рада:	Унети број: Страница 167 Поглавља 9 Референци 245 Табела 26 Слика 24 Прилога 9
Научна област:	Биологија
Ужа научна област (научна дисциплина):	Генетика
Кључне речи / предметна одредница:	<i>COI</i> ген, <i>Cyt b</i> ген, <i>28S</i> рРНК ген, <i>ITS2</i> регион, <i>ddRAD-seq</i> , осолике муве, <i>Merodon ruficornis</i> група,
Апстракт на језику рада:	Тренд континуираног опадања укупне биолошке разноврсности и бројности инсеката опрашивача је препознат као један од највећих еколошких изазова са којима се савремени свет суочава. Криза биолошке разноврсности је захватила и фамилију осоликих мува (Diptera: Syrphidae), која заједно са пчелама, и неким другим инсектима чини већину врста опрашивача. С тим у вези, истиче се потреба за очувањем осоликих мува, као једне од главних карика одржања и функционалности како природних, тако и аграрних екосистема. Међутим, како део врста још увек није описан, напори да се детектује и објасни постојећа разноврсност су од посебног значаја. Велика разноврсност, заједно са присуством бројних блиско сродних и криптичних врста, у великој мери отежава идентификацију врста и процену таксономских односа унутар

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штапане и електронске верзије докторског рада и дозвола за објављивање личних података;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају у институцији у штапаном и електронском облику и не корице се са радом.

рода *Merodon* Meigen, 1803. Поред тога, треба имати у виду да су досадашње студије претежно засноване на сету од свега неколико корисних генетичких маркера, при чему услед континуираног неслагања морфолошких и молекуларних података, статус одређених таксона захтева даљу процену. Посебно захтевна је *Merodon ruficornis* група блиских и морфолошки сличних врста, чији је конзервациони значај представљен изузетно богатом разноврсношћу врста, као и присуством локалних ендема. Међутим, недостатак доследних и поузданих маркера са одговарајућим степеном резолуције, који би на молекуларном нивоу допринели идентификацији и утврђивању граница врста, као и нејасноће настале услед континуираних недоследности између различитих типова података, умногоме отежавају свеобухватно разумевање разноврсности ове групе. Према томе, основни циљ ове докторске дисертације подразумевао је одређивање генетичког диверзитета *M. ruficornis* групе применом постојећих и развојем нових молекуларних алата, чиме би се пружио јаснији увид у таксономију и омогућила процена еволуционих односа између испитиваних таксона. Истраживање је засновано на анализи варијабилности пет одабраних митохондријских и једарних региона (3' и 5' крај *COI* гена, регион *Cyt b* гена, *D2-3* експанзивни регион *28S* рРНК гена и *ITS2* регион), као и сета геномских података сачињеног од укупно 2912 локуса генерисаних применом *ddRAD-seq* методе. Сагледавање молекуларног диверзитета на основу панела од пет одабраних региона извршено је на узорку од 241 јединке које обухватају 15 различитих врста из групе, док је применом *ddRAD-seq* генотипизације обухваћено укупно 92 јединке из 12 различитих врста. Како би се омогућило целовито разумевање постојеће разноврсности као и еволуционе динамике, испитана је улога срединских фактора у обликовању обрасца генетичке разноврсности групе. Поред тога, имајући у виду потенцијални утицај бактерија из рода *Wolbachia* на еволуцију митохондријског генома, узорци су тестирани на присуство инфекције овим ендосимбионтом. Добијени резултати су указали на ограниченост митохондријских маркера у утврђивању граница између свих врста у оквиру групе, потврдивши на тај начин умањену поузданост приступа заснованог на примени само једног гена митохондријског генома. Међутим, узимајући у обзир да су региони мтДНК омогућили идентификацију већине таксона, може се закључити да су се анализирани митохондријски гени у одређеној мери показали као користан алат за испитивање таксономских граница унутар ове групе, али да се истиче потреба за њиховим комбиновањем са регионима једарног генома. Поред тога, откривено је да примена индела као додатног сигнала поспешује резолуцију испитиваних једарних маркера, доказавши тиме важност овог молекуларног алата у решавању таксономских питања у оквиру *M. ruficornis* групе врста. Наиме, утврђено је да варијабилност секвенце *ITS2* региона са бинарно записаним инделима представља изузетно моћан алат, који би требало узети у обзир као додатни карактер приликом идентификације таксона путем ДНК баркодинга. Са друге, иако *28S* рРНК ген показује ограничену информативност за утврђивање граница врста, овај једарни маркер је пружио додатну подршку у дефинисању одређених таксона, посебно када се уз варијабилност нуклеотидне секвенце користе и подаци засновани на инсерцијама и делецијама. Имајући у виду нижу стопу еволуционих промена овог гена у поређењу са анализираним протеин кодирајућим генима и регионом спејсера, истиче се потенцијал овог маркера као допуне у студијама процене филогенетских односа унутар групе. Међутим, анализе засноване на нуклеотидним секвенцама митохондријских гена, као и на комбинованом сету од укупно пет

	<p>митохондријских и једарних региона, нису пружиле јасан увид у филогенију групе, указавши притом на учесталост полифилије и парафилије врста. Насупрот томе, генерисањем великог броја генетичких маркера који у виду <i>SNP</i> података осликавају различите делове генома, <i>ddRAD-seq</i> метода је успешно разрешила еволуционе односе унутар <i>M. ruficornis</i> групе, потврдивши значај овог приступа, не само у таксономским студијама, већ и у процени филогенетских односа између блиско сродних немодел врста. Анализа сета геномских података омогућила је успешно раздвајање свих испитиваних врста, при чему је додатно указала на присуство интраспецијске диференцијације код врста са широм дистрибуцијом. Представљајући прву примену неке од <i>RAD-seq</i> метода у молекуларним студијама осолених мува, добијени резултати чврсто подржавају имплементацију овог алата приликом расветљавања таксономских изазова и нелогичности, како унутар рода <i>Merodon</i>, тако и код осталих представника фамилије Syrphidae. Проценом времена дивергенције утврђено да су драстичне климатске промене и фрагментација станишта током плеистоценске епохе, највероватније имале важну улогу у обликовању биолошке разноврсности и диверзификацији митохондријских линија. У прилог томе иду резултати испитивања улоге срединских фактора на генетички диверзитет <i>M. ruficornis</i> групе, на основу којих је утврђен значајан допринос геопросторних и биоклиматских карактеристика у обликовању обрасца дистрибуције хаплотипова испитиваних митохондријских гена. Додатно је испитивањем генерисаних <i>SNP</i> података откривена варијација у доприносу различитих срединских карактеристика на образац генетичког диверзитета код врста <i>M. ruficornis</i> групе, указујући тиме да различити механизми имају улогу у креирању диверзификације унутар ових блиско сродних врста. Присуство <i>Wolbachia</i> ендосимбионта је забележено код свих врста, изузев <i>M. hoplitis</i>, при чему се инциденца не може довести у везу са географском дистрибуцијом, као ни са варијантом мтДНК која је присутна код јединки заражених врста. Сагледавањем добијених резултата се може закључити да таксономске и филогенетске нелогичности у митохондријском диверзитету <i>M. ruficornis</i> групе, највероватније представљају средински обликован сигнал инкорпорације митохондријског генома једне врсте у другу. Резултати ове дисертације указују на важност примене молекуларних маркера смештених у различитим деловима генома, који пружају целовитији увид у процесе диференцијације и еволуциону историју групе. Међутим, уочено присуство популационе структурираности унутар врста са широм дистрибуцијом би, у духу интегративног приступа, требало истражити применом морфометријских карактера, уз додатне анализе добијених <i>SNP</i> података. Са тим у вези, истиче се потреба за даљим испитивањима постојеће разноврсности, које би имало за циљ утврђивање линија са независним еволуционим током и пружање детаљнијег увида у разноврсност групе.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	28.10.2021.
Датум одбране: (Попуњава накнадно институција)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	<p>Председник: др Анте Вујић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: др Михајла Ђан, редовни професор, Природно-математички</p>

	<p>факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>Члан: др Слободан Давидовић, виши научни сарадник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, Универзитет у Београду</p> <p>Члан: др Сања Веселић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду</p> <p>др Љиљана Шашић Зорић, научни сарадник, Институт Биосенс – Истраживачко-развојни институт за информационе технологије биосистема, Универзитет у Новом Сад</p>
Напомена:	

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Iva Gorše
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	dr Mihajla Đan, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad dr Ljiljana Šašić Zorić, research associate, Biosense Institute – Institute for Research and Development of Information Technology in Biosystems, University of Novi Sad
Thesis title in English:	Genetic diversity of <i>Merodon ruficornis</i> group (Diptera: Syrphidae)
Language and script:	Serbian language, cyrillic
Physical description:	Number of: Pages 167 Chapters 9 References 245 Tables 26 Illustrations 24 Appendices 9
Scientific field:	Biology
Scientific subfield (scientific discipline):	Genetics
Subject, Key words:	COI gene, Cyt b gene, 28S rRNA gene, ITS2 region, ddRAD-seq, hoverflies, <i>Merodon ruficornis</i> group
Abstract in English:	Pollinator diversity loss is considered to be one of the most significant ecological problems of the Anthropocene. The biodiversity crisis has also affected hoverflies (Diptera: Syrphidae), known as the prominent ‘non-bee’ pollinators group. Considering the threat of pollinator decline to seriously affect ecosystem function and food security, the conservation of pollinating insects has become of utmost importance, entailing the accurate taxa identification. Nevertheless, as the species diversity is still undetected, efforts to detect and describe the existing biodiversity are of particular importance. Assessing taxonomic relationships within the genus <i>Merodon</i> Meigen, 1803 has been a challenge due to the high diversity and presence of multiple cryptic taxa, together with the lack of consistent and reliable diagnostic markers. Although this genus has been subject to numerous systematics and taxonomy studies, so far molecular analyses have been limited to the panel of just a few useful genetic markers and there is persisting incongruence between different

² The author of the doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authorship,
5B – Statement that the printed and e-version of the doctoral dissertation are identical and authorization to use personal data,
5r – Copyright statement.

The paper and e-versions of Statements are held at the institution and are not included into the printed thesis.

taxonomic tools in certain groups, so the status of some species still requires clarification. Discordance between results of different studies using different approaches to reveal taxonomic boundaries is especially relevant in the *Merodon ruficornis* group of morphologically similar closely related species, characterized by a significantly high level of species diversity, as well as endemism in comparison with other groups from *Merodon* genus. Considering persisting incongruence between different approaches and the fact that insufficiently informative DNA sequences have thus far been used for resolving group, there is a crucial need to introduce additional molecular markers into analysis with the aim to delineate taxa and clarify species phylogenetic relationships. Therefore, the primary objectives of this doctoral dissertation were to evaluate genetic diversity of *M. ruficornis* group using DNA sequences of five selected mitochondrial and nuclear genetic region (3' and 5' fragments of mitochondrial COI gene, region of Cyt b gene, D2–3 expansion fragment of the 28S rRNA gene and ITS2 region), together with the genomic data panel comprised of 2912 genome-wide generated using ddRAD-seq methodology. Analyses of molecular diversity based on the panel of five selected regions were performed on a sample of 241 individuals that include 15 different species from the group, while the application of the ddRAD-seq genotyping included a total of 92 individuals from 12 different species. In order to enable a comprehensive understanding of the existing diversity as well as the evolutionary dynamics, the role of environmental factors in shaping the pattern of genetic diversity of the group was examined. In addition, given the potential influence of endosymbiotic bacteria from the genus *Wolbachia* on the evolution of the mitochondrial genome, the samples were tested for the presence of infection. The obtained results indicated the limited resolution power of mitochondrial markers in molecular taxonomy of *M. ruficornis* group, confirming the problematic reliability of the single-locus studies. However, considering that the mtDNA regions enabled the identification of most taxa, it can be concluded that the analysed mitochondrial genes have proved their usefulness to a certain extent. Still, the analysis of these molecular marker should be proceed with caution due to the limited resolution power of mtDNA in identifying boundaries between *M. ruficornis* species. Therefore, it is advisable to analyse nuclear markers alongside with the mitochondrial regions. On the other hand, indels within analysed nuclear regions have been proved as a valuable molecular tool for the taxa delimitation within the *M. ruficornis*, strongly proposing the use of indels as an additional phylogenetic signal for resolving taxonomic problems within *Merodon*. Results revealed that the ITS2 nuclear region with binary coded indels represents a powerful diagnostic tool and it should be considered as addition to the DNA barcoding. Although, 28S rRNA gene is more conservative compared to the analysed protein coding genes and the spacer region, this marker provides an additional support for defining some taxa, especially when nucleotide sequences with coded indels are used. Thus, the variability of this nuclear marker could have potential as a complement tool in phylogenetic studies of the group. However, analyses based on nucleotide sequences of mitochondrial genes, as well as on a combined set of the five selected mitochondrial and nuclear regions, did not provide a clear insight into the phylogeny of the group, indicating presence of polyphyletic and paraphyletic species. Conversely, genome-wide ddRAD-seq data successfully resolved the evolutionary relationships within the *M. ruficornis* group, confirming the importance of this approach, not only in taxonomic studies, but also in the assessment of phylogenetic relationships between closely related non-model species. Genomic data clearly distinguished all examined species, additionally revealing intraspecific differentiation within widely distributed species. The obtained results strongly support the implementation of ddRAD-

	<p>seq tool in elucidating taxonomic challenges within the genus <i>Merodon</i>, as well as within other hoverfly genera. According to the divergence time estimates, mtDNA lineage diversification within the <i>M. ruficornis</i> group probably took place during Pleistocene climatic changes as a consequence of the species' range alterations. Moreover, results of this dissertation revealed that environmental factors significantly contributed to the established pattern of mtDNA variability. Furthermore, analyses of the generated SNP data revealed that different environmental factors contribute differently to the pattern of genetic diversity that is observed within four different <i>M. ruficornis</i> species, indicating that different mechanisms promote diversification within these closely related species. The presence of endosymbiotic bacteria from the genus <i>Wolbachia</i> has been shown in all of the analysed species except <i>M. hoplitis</i>, so the incidence could not be related to the geographical distribution, nor to the mtDNA variant present in individuals of the infected species. Considering all above, it could be concluded that the mitochondrial diversity of the <i>M. ruficornis</i> group most likely represents an environmentally shaped signal of the incorporation of the mitochondrial genome of one species into another. Obtained results point out the importance of applying molecular markers located in different parts of the genome, which provide a more comprehensive insight into the processes of differentiation and the evolutionary history of the group. However, the observed presence of population structure should be further investigated using both morphometric characters and the additional analyses of the obtained SNP panel, in order to provide a more detailed insight into the diversity of the group.</p>
Date of endorsement by the scientific board:	28.10.2021
Date of defence: (Filled in by the institution)	
Thesis defence board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>Chair: dr Ante Vujić, full professor, Faculty of Science, University of Novi Sad</p> <p>Member: dr Mihajla Đan, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p> <p>Member: dr Slobodan Davidović, senior research associate, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", University of Belgrade</p> <p>Member: dr Sanja Veselić, assistant professor, Faculty of Science, University of Novi Sad</p> <p>Member: dr Ljiljana Šašić Zorić, research associate, Biosense Institute – Institute for Research and Development of Information Technology in Biosystems, University of Novi Sad</p>
Note:	

Садржај

1. Увод	1
2. Преглед литературе	4
2.1. Опште карактеристике осоликих мува са посебним освртом на <i>Merodon ruficornis</i> групу врста (Diptera: Syrphidae)	4
2.1.1. Опште карактеристике осоликих мува и њихов значај	4
2.1.2. Опште карактеристике рода <i>Merodon</i> Meigen, 1803	5
2.1.3. Истраживања таксономских односа унутар <i>Merodon ruficornis</i> групе врста ...	6
2.2. Таксономија у служби очувања укупне биолошке разноврности осоликих мува..	8
2.2.1. Интегративни приступ у таксономији	10
2.2.2. Примена молекуларних маркера у таксономији	12
3. Циљеви	22
4. Материјал и методе	24
4.1. Материјал	24
4.2. Методе	25
4.2.1. Изолација геномске ДНК	25
4.2.2. Анализа молекуларних маркера	27
4.2.3. Утврђивање присуства <i>Wolbachia</i> инфекције	31
4.2.4. Статистичка анализа резултата	32
4.2.5. Одређивање утицаја срединских фактора на обликовање генетичког диверзитета	41
5. Резултати	45
5.1. Молекуларни диверзитет одабраних митохондријских и једарних генетичких региона	46
5.1.1. Варијабилност секвенце митохондријског <i>COI</i> гена	46
5.1.2. Варијабилност секвенце митохондријског <i>Cyt b</i> гена	55
5.1.3. Варијабилност једарног <i>28S</i> рРНК гена	58
5.1.4. Варијабилност једарног <i>ITS2</i> региона	63
5.2. Кластер анализе и процена филогенетских односа унутар <i>Merodon ruficornis</i> групе врста	68
5.3. Процена времена раздајања линија унутар <i>Merodon ruficornis</i> групе врста	90
5.4. Провера присуства унутарћелијског симбионта из рода <i>Wolbachia</i>	92

5.4.1. Утицај срединских карактеристика на генетички диверзитет <i>Merodon ruficornis</i> групе врста.....	95
6. Дискусија.....	107
6.1. Евалуација молекуларних алата од значаја за одређивање генетичког диверзитета унутар и између врста у оквиру <i>Merodon ruficornis</i> групе врста	107
6.2. Диверзификација линија унутар <i>Merodon ruficornis</i> групе врста као резултат климатских промена током Плеистоцена	120
6.3. Присуство <i>Wolbachia</i> бактеријског ендосимбионта код врста из <i>Merodon ruficornis</i> групе врста	122
6.4. Утицај срединских фактора у обликовању генетичког диверзитета <i>Merodon ruficornis</i> групе врста	126
7. Закључак.....	130
8. Литература	133
9. ПРИЛОЗИ.....	151
10.1. Прилог 1	152
10.2. Прилог 2	157
10.3. Прилог 3	158
10.4. Прилог 4	162
10.5. Прилог 5	163
10.6. Прилог 6	164
10.7. Прилог 7	165
10.8. Прилог 8	166
10.9. Прилог 9	167

Листа илустрација

- Слика 1.** Шематски приказ корака у примени методе секвенцирања везаног за дупла рестрикциона места (енгл. *Double digest restriction-site associated DNA, ddRAD-seq*). PE — рестрикционе ендонуклеазе.20
- Слика 2.** Област узорковања врста из *Merodon ruficornis* групе са означеним локалитетима узорковања.24
- Слика 3.** Шематски приказ биоинформатичке обраде *ddRAD-seq* података применом *ipyRAD* програмског пакета.36
- Слика 4.** *Median-joining* мрежа *COI* хаплотипова *Merodon ruficornis* групе врста дефинисаних на основу секвенци комбинованих фрагмената 3' и 5' *COI* гена.48
- Слика 5.** *Median-joining* мрежа *Cyt b* хаплотипова *Merodon ruficornis* групе врста.56
- Слика 6.** *Median-joining* мрежа 28S рРНК генотипова *Merodon ruficornis* групе врста.62
- Слика 7.** *Median-joining* мрежа *ITS2* генотипова *Merodon ruficornis* групе врста.67
- Слика 8.** Бајесово стабло *Merodon ruficornis* групе врста засновано на секвенцама комбинованих 3' и 5' фрагмента митохондријског *COI* гена. Вредности постериорне вероватноће су приказане поред чворова.69
- Слика 9.** Стабло највеће вероватноће (енгл. *Maximum Likelihood*) *Merodon ruficornis* групе врста засновано на секвенцама комбинованих 3' и 5' фрагмента митохондријског *COI* гена. *Bootstrap* вредности статистичке подршке клади су приказане поред чворова.70
- Слика 10.** Бајесово стабло *Merodon ruficornis* групе врста засновано на секвенцама митохондријског *Cyt b* гена. Вредности постериорне вероватноће су приказане поред чворова.75
- Слика 11.** Стабло највеће вероватноће (енгл. *Maximum Likelihood*) *Merodon ruficornis* групе врста засновано на секвенцама митохондријског *Cyt b* гена. *Bootstrap* вредности статистичке подршке клади су приказане поред чворова.76
- Слика 12.** Бајесово стабло *Merodon ruficornis* групе врста засновано на секвенцама 28S рРНК гена, са вредностима постериорне вероватноће приказаним поред чворова. а) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце без индела. б) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце заједно са бинарно прочитаним инделима.78

Слика 13. Стабло највеће вероватноће (енгл. *Maximum Likelihood*) *Merodon ruficornis* групе врста на секвенцама 28S рРНК гена, са вредностима *bootstrap* статистичке подршке приказаним поред чворова. а) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце без индела. б) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце заједно са бинарно прочитаним инделима.79

Слика 14. Бајесово стабло *Merodon ruficornis* групе врста засновано на секвенцама *ITS2* региона, са вредностима постериорне вероватноће приказаним поред чворова. а) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце без индела. б) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце заједно са бинарно прочитаним инделима.80

Слика 15. Стабло највеће вероватноће (енгл. *Maximum Likelihood*) *Merodon ruficornis* групе врста на секвенцама *ITS2* региона, са вредностима *bootstrap* статистичке подршке приказаним поред чворова. а) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце без индела. б) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце заједно са бинарно прочитаним инделима.81

Слика 16. Филогенетско Бајесово стабло *Merodon ruficornis* групе врста засновано на секвенцама комбинованих митохондријских и једарних маркера (3 и 5' фрагменти *COI* гена, *Cyt b* ген, 28S рРНК ген и *ITS2* регион), са вредностима постериорне вероватноће приказаним поред чворова. а) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце без индела. б) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце заједно са бинарно прочитаним инделима унутар испитиваних једарних маркера.84

Слика 17. Филогенетско стабло највеће вероватноће (енгл. *Maximum Likelihood*) *Merodon ruficornis* групе врста засновано на секвенцама комбинованих митохондријских и једарних маркера (3 и 5' фрагменти *COI* гена, *Cyt b* ген, 28S рРНК ген и *ITS2* регион), са вредностима *bootstrap* статистичке подршке приказаним поред чворова. а) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце без индела. б) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце заједно са бинарно прочитаним инделима унутар испитиваних једарних маркера.85

Слика 18. Филогенетско стабло највеће вероватноће (енгл. *Maximum Likelihood*) *Merodon ruficornis* групе врста засновано на *ddRAD-seq* геномским подацима, са вредностима *bootstrap* статистичке подршке приказаним поред чворова.87

Слика 19. Стабло врста *Merodon ruficornis* групе засновано на коалесцентној анализи *ddRAD-seq* геномских података, са вредностима *bootstrap* статистичке подршке приказаним поред чворова.89

Слика 20. Хронограм диверзификације митохондријских линија унутар *Merodon ruficornis* групе врста конструисан применом програмског пакета *BEAST*. Просечна старост чворова је у милионима година процењена употребом *birth–death* модел настанка врста, док је као модел молекуларног сата узет *lognormal relaxed clock*.91

Слика 21. Приказ релативног доприноса појединачних срединских варијабли у предикцији фреквенције алела код *Merodon armipes* врсте, изражен у виду важности која је коригована R^2 грешком.103

Слика 22. Приказ релативног доприноса појединачних срединских варијабли у предикцији фреквенције алела код *Merodon auripes* врсте, изражен у виду важности која је коригована R^2 грешком.104

Слика 23. Приказ релативног доприноса појединачних срединских варијабли у предикцији фреквенције алела код *Merodon loewi* врсте, изражен у виду важности која је коригована R^2 грешком.105

Слика 24. Приказ релативног доприноса појединачних срединских варијабли у предикцији фреквенције алела код *Merodon trebevicensis* врсте, изражен у виду важности која је коригована R^2 грешком.106

Листа табела

Табела 1. Нуклеотидне секвенце и називи почетница коришћених за умножавање одабраних митохондријских и једарних региона код инсеката.	29
Табела 2. Основни параметри генетичког диверзитета <i>Merodon ruficornis</i> групе врста засновани на секвенцама комбинованих 3' и 5' региона митохондријског <i>COI</i> гена. ...	46
Табела 3. Преглед хаплотипова <i>Merodon ruficornis</i> групе врста дефинисаних на основу секвенци комбинованих фрагмената 3' и 5' <i>COI</i> гена.	49
Табела 4. Преглед хаплотипова <i>Merodon ruficornis</i> групе врста дефинисаних на основу секвенци 5'фрагмента <i>COI</i> гена.	52
Табела 5. Преглед хаплотипова <i>Merodon ruficornis</i> групе врста дефинисаних на основу секвенци 3'фрагмента <i>COI</i> гена.	53
Табела 6. Основни параметри генетичког диверзитета <i>Merodon ruficornis</i> групе врста засновани на секвенцама 5' региона митохондријског <i>COI</i> гена.	54
Табела 7. Основни параметри генетичког диверзитета <i>Merodon ruficornis</i> групе врста засновани на секвенцама 3' региона митохондријског <i>COI</i> гена.	54
Табела 8. Основни параметри генетичког диверзитета <i>Merodon ruficornis</i> групе врста засновани на секвенцама митохондријског <i>Cyt b</i> гена.	55
Табела 9. Преглед хаплотипова <i>Merodon ruficornis</i> групе врста дефинисаних на основу секвенци <i>Cyt b</i> гена.	57
Табела 10. Преглед генотипова <i>Merodon ruficornis</i> групе врста дефинисаних на основу 28S рРНК гена. а) Генотипови дефинисани на основу нуклеотидних секвенци 28S рРНК гена, третирајући нуклеотидне празнине настале инсерцијама и делецијама као непостојеће податке. б) Генотипови дефинисани на основу нуклеотидне секвенце 28S рРНК гена заједно са инделима.	59
Табела 11. Основни параметри генетичког диверзитета <i>Merodon ruficornis</i> групе врста засновани на секвенцама једарног 28S рРНК гена.	61
Табела 12. Основни параметри генетичког диверзитета <i>Merodon ruficornis</i> групе врста засновани на варијабилности насталој услед инсерција и делеција унутар секвенце једарног 28S рРНК гена.	61

- Табела 13.** Преглед генотипова *Merodon ruficornis* групе врста дефинисаних на основу *ITS2* региона. а) Генотипови дефинисани на основу нуклеотидних секвенци *ITS2* региона, третирајући нуклеотидне празнине настале инсерцијама и делецијама као непостојеће податке. б) Генотипови дефинисани на основу нуклеотидне секвенце *ITS2* региона заједно са инделима.64
- Табела 14.** Основни параметри генетичког диверзитета *Merodon ruficornis* групе врста засновани на секвенцама једарног *ITS2* региона.66
- Табела 15.** Основни параметри генетичког диверзитета *Merodon ruficornis* групе врста засновани на варијабилности насталој услед инсерција и делеција унутар секвенце једарног *ITS2* региона.66
- Табела 16.** Приказ просечних вредности некориговане генетичке дистанце (*p - uncorrected pairwise distance*) заснованих на комбинованим секвенцама 3' и 5' фрагмента *COI* гена између парова врста *Merodon ruficornis* групе.72
- Табела 17.** Приказ вредности некоригованих просечних генетичких дистанци (*p - uncorrected pairwise distance*) заснованих на секвенцама 5' фрагмента митохондријског *COI* гена између парова врста *Merodon ruficornis* групе.73
- Табела 18.** Резултати тестирања на *Wolbachia* јединки припадника различитих врста *Merodon ruficornis* групе.93
- Табела 19.** Приказ резултата добијених *DistLM* маргиналним приступом, који указује на допринос појединачних срединских варијабли на дистрибуцију хаплотипова комбинованих 3' и 5' фрагмента *COI* гена.96
- Табела 20.** Сумарни приказ доприноса најоптималнијег регресионог модела у обликовању обрасца дистрибуције хаплотипова комбинованих 3' и 5' фрагмента *COI* гена.96
- Табела 21.** Приказ резултата добијених *DistLM* маргиналним приступом, који указује на допринос појединачних срединских варијабли на дистрибуцију хаплотипова 5' фрагмента *COI* гена.98
- Табела 22.** Сумарни приказ доприноса најоптималнијег регресионог модела у обликовању обрасца дистрибуције хаплотипова 5' фрагмента *COI* гена.98
- Табела 23.** Приказ резултата добијених *DistLM* маргиналним приступом, који указује на допринос појединачних срединских варијабли на дистрибуцију хаплотипова 3' фрагмента *COI* гена.100
- Табела 24.** Сумарни приказ доприноса најоптималнијег регресионог модела у обликовању обрасца дистрибуције хаплотипова 3' фрагмента *COI* гена.100

Табела 25. Приказ резултата добијених *DistLM* маргиналним приступом, који указује на допринос појединачних срединских варијабли на дистрибуцију хаплотипова *Cyt b* гена.102

Табела 26. Сумарни приказ доприноса најоптималнијег регресионог модела у обликовању обрасца дистрибуције хаплотипова *Cyt b* гена.102

Листа прилога

- Прилог 1: Табела П1.** Листа узорака *Merodon ruficornis* групе врста са локалитетима прикупљања, као и подацима о јавно доступним секвенцама испитиваних региона које су претходно депоноване у Банку Гена.152
- Прилог 2: Табела П2.** Деветнаест биоклиматских варијабли коришћених за креирање модела потенцијалне дистрибуције врста.157
- Прилог 3: Табела П3.** Листа узорака анализираних применом *ddRAD-seq* приступа, уз информације о продукованим секвенцама и *ddRAD* локусима.158
- Прилог 4: Табела П4.** Приказ вредности некоригованих просечних генетичких дистанци (p - *uncorrected pairwise distance*) заснованих на секвенцама комбинованих 3' и 5' фрагмента митохондријског *COI* гена између парова врста и / или популација унутар *Merodon ruficornis* групе.162
- Прилог 5: Табела П5.** Приказ вредности некоригованих просечних генетичких дистанци (p - *uncorrected pairwise distance*) заснованих на секвенцама 5' фрагмента митохондријског *COI* гена између парова врста и / или популација унутар *Merodon ruficornis* групе.163
- Прилог 6: Слика П6.** Кумулативна важност утицаја градијента вредности појединачних срединских карактеристика на промене у учесталости алела код *Merodon armipes* врсте.164
- Прилог 7: Слика П7.** Кумулативна важност утицаја градијента вредности појединачних срединских карактеристика на промене у учесталости алела код *Merodon auripes* врсте.165
- Прилог 8: Слика П8.** Кумулативна важност утицаја градијента вредности појединачних срединских карактеристика на промене у учесталости алела код *Merodon loewi* врсте.166
- Прилог 9: Слика П9.** Кумулативна важност утицаја градијента вредности појединачних срединских карактеристика на промене у учесталости алела код *Merodon trebevicensis* врсте.167

1. Увод

Широм света забележен је тренд континуираног опадања укупне биолошке разноврсности, настао као резултат активности које доводе до разарања и поремећаја природних екосистема. Упркос великој разноликости инсеката, бројност њихових врста и популација драматично опада на глобалном нивоу (Wagner и сар., 2020), при чему је смањење биолошке разноврсности и бројности опрашивача, као важне компоненте еколошких процеса, препознато као један од највећих еколошких изазова са којима се савремени свет суочава (Marshman и сар., 2019; Doyle и сар., 2020).

Криза биолошке разноврсности захватила је и фамилију осоликих мува (Diptera: Syrphidae), које заједно са пчелама, лептирима и другим инсектима обухватају већину врста опрашивача (Doyle и сар., 2020). Према чине врстама богату фамилију, са око 6000 до сада описаних врста (Rotheray и Gilbert, 2011), осолике муве су у Европи препознате као угрожена група (Speight и сар., 2020). Узимајући у обзир да представљају изузетно важне инсекатске опрашиваче, значајне не само у природним стаништима, већ и у агроекосистемима (Orford и сар., 2015; Doyle и сар., 2020; Raguso, 2020), јасна је потреба за очувањем ове инсекатске групе, као једне од главних карика одржања и функционалности различитих екосистема. Стога је на темељу пројекта Европске уније о статусу и трендовима европских опрашивача (енгл. *Status and Trends of European Pollinators, STEP*) припремљена прва Европска црвена листа врста осоликих мува (енгл. *European Red List of Hoverflies*) (Vujić и сар., 2022a), која заједно са подацима о лептирима и пчелама представља темељ будућег мониторинга опрашивача у Европи (*STING* пројекат Европске комисије). Међутим, како део европских врста још увек није описан, напори да се детектује и објасни постојећа разноврсност су од посебног значаја.

Род *Merodon* Meigen, 1803 представља један од врстама најбогатијих родова у оквиру фамилије осоликих мува, са више од 230 до сада описаних врста (Vujić и сар., 2021a). Услед изузетног богатства врстама и њихове функције у опрашивању, диверзитет овог рода представља фокус великог броја истраживања усмерених ка процени и бољем разумевању различитих нивоа укупне биолошке разноврсности која је присутна унутар овог рода. Међутим, и поред бројних студија, таксономске границе и односи између врста унутар рода *Merodon* још увек нису у потпуности разјашњени и

представљају изузетан изазов обзиром на велику разноврсност, као присуство бројних блиско сродних и морфолошки сличних и криптичних врста (Vujić и сар., 2021a). Додатни проблем представља недостатак поузданих и информативних маркера, који би на молекуларном нивоу допринели идентификацији и утврђивању граница врста унутар овог рода. Иако је примена анализе варијабилности ДНК секвенци одабраних региона генома осоликних мува у значајној мери допринела разумевању таксономије бројних група, досадашње студије су претежно засноване на сету од свега неколико корисних генетичких маркера, при чему услед континуираног неслагања морфолошких и молекуларних података, статус одређених таксона захтева даљу процену (Ståhls et al., 2009; Porović и сар., 2015; Vujić и сар., 2020a).

Један од најзахтевнијих задатака у таксономији осоликних мува из рода *Merodon* јесте дефинисање јасних граница између врста и расветљавање филогенетских односа унутар установљених група врста. Посебно захтевна је *Merodon ruficornis* група блиских и морфолошки сличних врста, чији је конзервациони значај у изузетно богатом специјском диверзитету, као и присуству локалних ендема, који су као такви изузетно осетљиви на промене у екосистему (Radenković и сар., 2002; Ståhls и сар., 2009; Vujić и сар., 2012; Andrić и сар., 2017). С тим у вези, истиче се потреба за целовитим разумевањем разноврсности ове групе у циљу дефинисања врста, као основних јединица конзервационог управљања. Међутим, недостатак доследних и поузданих маркера са одговарајућим степеном резолуције, као и нејасноће у границама врста услед континуираних недоследности између различитих типова података, умногоме отежавају овај задатак (Radenković и сар., 2002; Milankov и сар., 2008; Francuski и сар., 2009; Ståhls и сар., 2009; Vujić и сар., 2012; Andrić и сар., 2017). Наиме, иако секвенце 3' и 5' региона митохондријског гена за цитохром ц оксидазу I (*COI*) представљају најчешће коришћен и веома користан алат у молекуларној таксономији осоликних мува, варијабилност ових фрагмената није омогућила успешно раздвајање морфолошки јасних врста из *M. ruficornis* групе (Milankov и сар., 2008; Ståhls и сар., 2009). Поред тога, треба имати у виду да приступ заснован на примени само једног гена свакако има одређена ограничења, посебно уколико се ради о региону митохондријског генома (Galtier и сар., 2009; Hubert и Hanner, 2015). Како фрагменти митохондријског *COI* гена представљају једине молекуларне маркере зановане на анализи ДНК секвенце који су коришћени у таксономији ове групе осоликних мува, у анализу је неопходно увести додатне генетичке маркере, поготово регионе једарне

ДНК. Према томе, један од првих и најважнијих корака у очувању, како *M. ruficornis* групе, тако и других група врста унутар рода *Merodon*, јесте правилна делинеација и идентификација врста у циљу прецизног дефинисања еволуционо значајних јединица, чему значајно доприноси развој нових молекуларних алата који пружају свеобухватну и темељну основу за проучавање диверзитета и разјашњавање граница и односа унутар таксономски изазовних комплекса и група.

2. Преглед литературе

2.1. Опште карактеристике осоликих мува са посебним освртом на *Merodon ruficornis* групу врста (Diptera: Syrphidae)

2.1.1. Опште карактеристике осоликих мува и њихов значај

Осолике муве, сирфиде (Diptera: Syrphidae) представљају врстама богату фамилију инсеката, са око 6 000 до сада описаних врста (Rotheray и Gilbert, 2011). Поред богатства врста, одликује их и висока адаптивна радијација. Стога заузимају широк ареал, при чему врсте насељавају различите типове станишта од нивоа мора до 3500 метара надморске висине. Њихово присуство није забележено једино на Антартику и удаљеним океанским острвима. Назив осолике муве потиче од адаптивног својства да распоредом трака и боја у абдоминалном и торакалном региону oponашају пчеле, осе или бумбаре, што представља својеврсни механизам одбране од потенцијалних предатора (Edmunds, 2008; Edmunds и Reader 2014; Leavey и сар., 2021). Овакав вид заштите назива се Бејтсова мимикрија (Bates, 1862) и код одређених представника осоликих мува, као што су врсте рода *Merodon* Meigen, 1803 је, поред апосематске обојености, представљен и бихевиоралном мимикријом, односно oponашањем покрета крила и ногу (Golding и сар., 2005; Penney и сар., 2014), као и звука које опнокрилци (Hymenoptera) производе током лета (Moore и Hassall, 2016).

Фамилију сирфида карактерише изузетна разноликост, како током ларвалног развића, тако и на нивоу адулта. Исхрана ларви обухвата различите облике фитофагије, копрофагије, сапрофагије, али и зоофагије, док се адулти углавном хране нектаром и поленом биљака. Препознате су као изузетно важни инсекти опрашивачи, значајни не само у природним стаништима, већ и у агроекосистемима (Orford и сар., 2015; Doyle и сар., 2020; Raguso, 2020; Toivonen и сар., 2022). Забележено је да у Европи посећују више од 70% врста дивљих биљака у чијем опрашивању посредују животиње (Rotheray и Gilbert, 2011). Поред тога, учествују у опрашивању најмање 72% култивисаних биљака, за чију је производњу процењено да на светском нивоу доноси приход од око 300 милијарди долара годишње (Rader и сар., 2020; Doyle и сар., 2020;). Често су представљене као друга најважнија инсекатска група опрашивача, након пчела (Larsson, 2005; Rader и сар., 2020). Међутим, за разлику од пчела, осолике муве у

екосистему поред опрашивања могу да имају улогу и биоиндикатора квалитета станишта, разлагача органске материје биљног и животињског порекла, као и регулатора бројности штетних инсеката (Ricarte и сар., 2008; Rotheray и Gilbert, 2011; Andrić и сар., 2014; Jovičić и сар., 2017).

2.1.2. Опште карактеристике рода *Merodon* Meigen, 1803

Фамилију Syrphidae Latreille, 1802 чине четири подфамилије: Microdontinae, Syrphinae, Eristalinae (Thompson и Rotheray, 1998) и Pipizinae (Mengual и сар., 2015). Род *Merodon* Meigen, 1803 припада подфамилији Eristalinae, и са више од 230 фитофагних врста чини водећи род осоликих мува по богатству врстама у Европи (Vujić и сар., 2021a). Распрострањен је широм Палеарктика и Палеотропског региона, посебно на Балканском, Анадолијском и Пиринејском полуострву, која су позната као центри биолошке разноврсности са великим бројем локалних ендемских врста (Marcos-García и сар., 2007; Rotheray и Gilbert, 2011; Vujić и сар., 2011; Vujić и сар., 2019; Radenković и сар., 2020). Његова изузетна разноликост у региону Медитерана је у корелацији са високим диверзитетом биљака које представљају домаћине током преимагиналног развића осоликих мува из *Merodon* рода. Адултне јединке су препознате као важни опрашивачи великог броја дивљих и култивисаних монокотиледоних геофита, док се ларвално развиће одвија у подземним органима ових биљака (Hurkmans, 1993; Marcos-García и сар., 2007; Andrić и сар., 2014; Ricarte и сар., 2017; Preradović и сар., 2018; Aracil и сар., 2022; 2023). Претпоставља се да развој великих подземних органа, толерантних на исхрану ларви, код геофита представља прилагођавање биљака ларвама из рода *Merodon* (Ricarte и сар., 2008), а заузврат, адулти ових врста имају улогу у опрашивању њихових цветова. У потрази за поленом и нектаром представници рода *Merodon* посећују и друге цветнице, при чему се често срећу на цветовима биљних врста из фамилија Apiaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae и другим (Marcos-García и сар., 2007).

Диверзитет осоликих мува рода *Merodon* представља фокус великог броја истраживања усмерених ка процени и бољем разумевању, како фенотипске, тако и молекуларне разноликости присутне унутар овог рода. Међутим, и поред бројних студија, односи унутар овог рода још увек нису у потпуности разјашњени, те

представљају изузетан таксономски изазов, настао услед велике разноврсности и присуства бројних блиско сродних, морфолошки сличних, као и криптичних врста (Vujić и сар., 2021a). Додатни чинилац јесте недостатак поузданих и информативних генетичких маркера са довољним степеном резолуције, који би на молекуларном нивоу помогли кохерентној идентификацији и утврђивању граница врста унутар овог рода. Према резултатима претходних студија, род *Merodon* обухвата 24 групе врста, уз додатних 13 врста које не припадају ниједној од група (Vujić и сар., 2021a). Групе су разврстане у 5 монофилетских линија — *albifrons*, *aureus*, *avidus-nigritarsis*, *desuturinus* и *natans* (Šašić и сар.2016; Radenković и сар. 2018; Vujić и сар., 2021a).

2.1.3. Истраживања таксономских односа унутар *Merodon ruficornis* групе врста

Један од најзахтевнијих задатака у таксономији осоликих мува јесте расветљавање граница и филогенетских односа врста унутар *Merodon ruficornis* групе, која обухвата еволуционо блиске и морфолошки сличне врсте. Код ове групе је забележен изузетан специјски диверзитет, као и значајно присуство ендемских врста у односу на остале групе из рода (Radenković и сар., 2002; Milankov и сар., 2008; Francuski и сар., 2009; Ståhls и сар. 2009; Vujić и сар., 2012; Andrić и сар., 2017). Доминантно је распрострањена у регионима северног и источног Медитерана, са највећим диверзитетом на Балканском и Анадолијском полуострву. *Merodon ruficornis* група броји 21 тренутно описану врсту, од чега је 15 ендемских врста (71,4%) са ограниченом дистрибуцијом (Vujić и сар., 2012; 2022b). Додатни изазов у дефинисању таксономских граница врста унутар ове монофилетске групе огледа се у неподударности резултата добијених испитивањем морфолошких и до сада анализираних молекуларних маркера. Наиме, група је дефинисана на основу бројних апоморфних карактера, посебно у грађи мушких гениталија и задњих ногу, док је њено монофилетско порекло унутар *albifrons* линије подржано како морфолошким, тако и молекуларним подацима (Radenković и сар., 2002; Vujić и сар., 2012). Међутим, таксономија групе до нивоа врсте још увек није у потпуности разјашњена услед континуираних недоследности између различитих типова података.

Облик и величина крила показале су се као информативан дијагностички карактер и захваљујући њима су границе неколико врста поуздано дефинисане, при чему је додатно откривена и морфометријска варијабилност између различитих популација, која указује на високу структурираност унутар морфолошки јасно дефинисаних врста (Francuski и сар., 2009). Са друге стране, досадашња истраживања молекуларних података су указала на постојање неразрешених таксономских питања и нејасних граница морфолошки дефинисаних врста *M. ruficornis* групе: *M. armipes* Rondani, 1843, *Merodon loewi* van der Goot, 1964 и *M. papillus* Vujić, Radenković и Pérez-Vañón у Vujić и сар., 2007 (Milankov и сар., 2008; Ståhls и сар., 2009; Andrić и сар., 2017). Наиме, уочено је да различити молекуларни маркери не пружају конзистентне податке. Тако је полиморфност испитиваних алозимских локуса пружила подршку морфологијом утврђеним границама између *M. armipes*, *M. loewi*, *M. auripes* Sack, 1913, *M. ruficornis* Meigen, 1822 и *M. trebevicensis* Strobl, 1900, (Milankov и сар., 2008), док су применом молекуларних анализа *RAPD* (енгл. *Random Amplified Polymorphic DNA*) маркера успешно идентификоване четири врсте из *ruficornis* групе — *M. armipes*, *M. loewi*, *M. papillus* и *M. hoplitis* Hurkmans у Vujić и сар., 2012 (Andrić и сар., 2017). Насупрот томе, секвенце 3' и 5' региона митохондријског гена за цитохром ц оксидазу I (*COI*) су се, супротно очекивањима, показале као неадекватан алат у решавању таксономских изазова унутар ове групе, премда представљају најчешће коришћене и потврђено корисне маркере у молекуларној таксономији осоликих мува (Marcos-García и сар., 2011; Barkalov и Ståhls, 2015; Šašić и сар., 2016; Radenković и сар., 2018; Chroni и сар., 2017; Nedeljković и сар., 2020; Šašić Zorić и сар., 2020). Студија спроведена на узорцима са Балканског полуострва указала је да *M. loewi* дели заједнички 3' *COI* хаплотип са другим таксономом из *M. ruficornis* групе, односно са врстом *M. armipes*, без обзира на чињеницу да обе ове врсте представљају морфолошки јасно дефинисане таксоне (Milankov и сар., 2008). Поред тога, на основу варијабилности 5' фрагмента *COI* гена, познатог и као ДНК баркод, извршена је успешна идентификација и раздвајање свих *Merodon* таксона са Лезбоса, осим две врсте из *ruficornis* групе — *M. loewi* и *M. papillus*, за које је откривено да и поред јасних морфолошких разлика имају идентичну 5' *COI* нуклеотидну секвенцу (Ståhls и сар., 2009).

Упркос идеји о употреби *COI* гена као универзалног ДНК баркода у идентификацији и утврђивању граница врста (Hebert и сар., 2003), контрадикторни подаци добијени применом различитих молекуларних маркера код ове групе доводе у

питање примену варијабилности секвенце једног гена у дефинисању граница врста. Додатно разлике у еволуцији митохондријског и једарног генома наглашавају потребу примене и региона једарног генома у приступу ДНК баркодинка. Недавним истраживањем еколошких ниша *M. ruficornis* групе, утврђено је да еколошки фактори имају важну улогу у креирању обрасца дистрибуције, као и у процесу диверзификације сродних врста (Аџански и сар., 2017). Утицај разноликих климатских и других географских услова у подручјима распрострањења врста из ове групе, посебно током периода глацијације и интерглацијације, узроковао је велику разноврсност врста и присуство бројних локалних ендема у овој групи. Међутим, досадашње анализе молекуларне варијабилности унутар *M. ruficornis* групе ограничене су само на неке врсте са територије Балкана. С тим у вези, потребно је у анализу укључити додатне врсте и проширити подручје обухваћено истраживањем спрам ареала распрострањења, како би се омогућио свеобухватнији увид у генетички диверзитет групе.

2.2. Таксономија у служби очувања укупне биолошке разноврсности осоликих мува

Широм света забележен је тренд континуираног опадања укупне биолошке разноврсности који прети да угрози сва три нивоа диверзитета, односно диверзитет врста, као и генетички и екосистемски диверзитет. Упркос великој разноликости инсеката, бројност њихових врста и популација драматично опада на глобалном нивоу (Wagner и сар., 2020), при чему је убрзан губитак целокупне биолошке разноврсности инсеката опрашивача препознат као један од најзначајнијих еколошких проблема са којима се савремени свет суочава (Marshman и сар., 2019; Doyle и сар., 2020). Смањење биолошке разноврсности опрашивача, као важне компоненте еколошких процеса, може у озбиљној мери угрозити широк спектар различитих копнених станишта. Стога су широм света покренуте бројне иницијативе на националном и међународном нивоу, које за циљ имају очување дивљих инсеката опрашивача. Међу њима су: Serbian Pollinator Advice Strategy — SPAS (<https://spas.pmf.uns.ac.rs/>), затим EU Pollinators Initiative (https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/ip_23_281), Science and Technology for Pollinating Insects STING I и II, Status and Trends of European Pollinators STEP (www.STEP-project.net), FAO/UNEP/GEF Global Pollination Project IPI

(www.cbd.int/agro/pollinator.shtml), French Pollinator Initiative (<https://urbanbees.eu>), Pan-European assessment, monitoring and migration Of Stressors on the Health of BEEs — PoshBee (<https://poshbee.eu/>), African Pollinator Initiative API (www.arc.agric.za), The Oceania Pollinator Initiative, Iniciativa, Colombiana de Polinizadores ICPA (www.oceaniapollinator.org), Brazilian Pollinator Initiative BPI (www.webbee.org.br/bpi), Pan-European assessment, monitoring and migration Of Stressors on the Health of BEEs (<https://poshbee.eu>).

Осолике муве, заједно са пчелама, лептирима и неким другим инсектима чине већину врста опрашивача (Doyle и сар., 2020). Криза биолошке разноврсности захватила је и ову фамилију инсеката, тако да су на тлу Европе сирфиде препознате као угрожена група (Speight и сар., 2020). Узимајући у обзир да размножавање бројних биљних врста зависи од њихове активности, јасна је потреба за очувањем осоликих мува, као једне од главних карика одржања и функционалности како природних, тако и аграрних екосистема. Стога је пројекат Европске уније о статусу и трендовима европских опрашивача (енгл. *Status and Trends of European Pollinators, STEP*) покренуо акцију за развој прве Европске црвене листе врста осоликих мува (енгл. *European Red List of Hoverflies*), која заједно са подацима о лептирима и пчелама представља темељ будућег мониторинга опрашивача у Европи (*STING* пројекат Европске комисије). Процењено је да под угрожене таксоне потпада 37% од укупног броја врста осоликих мува у Европи (Vujić и сар., 2022b). Такође је у оквиру Европске црвене листе врста осоликих мува процењен статус европских представника *M. ruficornis* групе, од којих је за шест врста утврђено да припадају некој од три *IUCN* категорије угрожености, односно да су у питању рањиви, угрожени или критично угрожени таксони (Vujić и сар., 2022a): *Merodon abruzzensis* van der Goot, 1964, *Merodon alexandri* Popov, 2009, *Merodon gallicus* Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2012, *Merodon hoplitis*, *Merodon papillus*, *Merodon planiceps* Loew, 1862. Конзервациони значај *M. ruficornis* групе представљен је богатом разноврсношћу врста, као и значајним присуством локалних ендема са ограниченом дистрибуцијом, који су као такви осетљиви на промене у екосистему и склони изумирању. Са тим у вези, свеобухватна разноврсност групе мора бити разрешена како би се утврдиле јасне границе између врста, односно основне јединице конзервационог управљања. Међутим, овај задатак је отежан услед недостатка доследних и поузданих маркера са одговарајућим степеном резолуције. Према томе, један од основних корака ка очувању *M. ruficornis* групе, јесте утврђивање

граница врста дефинисањем и развојем нових молекуларних алата од значаја за таксономију и разумевање еволуционих односа између врста из ове групе.

Поред Европске црвене листе врста осоликих мува публикована је и Европска црвена листа таксонома за инсекте (*енгл. European Red List of Insect Taxonomists*), која указује на значај таксономских студија, као полазне тачке за даља истраживања али и примену у привредним гранама и законодавству (Hochkirch и сар., 2022). Таксономија пружа знање које је неопходно у праћењу биолошке разноврсности и представља предуслов за доношење сврсисходних одлука и мера на пољу конзервационе биологије, те је образовање нових генерација таксонома од пресудног значаја.

2.2.1. Интегративни приступ у таксономији

Изузетан напредак на пољу систематике и откривања специјског диверзитета омогућен је увођењем интегративног приступа у таксономији, који се заснива на сумирању информација добијених анализом различитих типова података. Тиме процес таксономског закључивања бива кохерентнији, тако да заједно са традиционалним морфолошким карактерима интегрише информације добијене испитивањем генетичких маркера, геометријске морфометрије, дистрибуције, као и еколошких захтева организама. Применом комплементарних података пореклом из различитих области истраживања, остварује се свеобухватан увид у постојећу биолошку разноврсност, што омогућава превазилажење несавршености морфолошки базираног приступа. С тим у вези, развојем интегративне таксономије унапређен је процес проналаска и описа нових врста, посебно у случајевима где само анализа морфолошких карактера није довољна за расветљавање таксономских односа. Приступ одређивања граница врста у интегративној таксономији требао би се заснивати на примени основних података који су представљени морфолошким и молекуларним стањима, уз могућност инкорпорирања додатних карактеристика у анализу (Yeates и сар., 2011), при чему све дефинисане врсте и њихове границе представљају хипотезу и као такве могу бити поново тестиране применом нових информација и типова податка, који су другачији од оних на којима је хипотеза утемељена. Стога се откривању врста може приступити на два начина. Први приступ подразумева испитивање таксономских граница без претходне хипотезе о броју присутних врста, тако да хипотезе произилазе из самих узорака. Други начин откривања врста се заснива на тестирању претходно дефинисане хипотезе, при чему почетна хипотеза о постојању врста може бити изнета на основу

једног типа података и бити тестирана применом другог. Како би се хипотеза прихватила неопходно је да буде подржана са више од 95% узорака (Schlick-Stainer, 2010).

Интегративни приступ обухвата два основна механизма таксономског закључивања, која су дефинисана према начину на који се сумирају подаци различитих дисциплина, односно сумирање додавањем и сумирање подударањем (Padiál и сар., 2010). Сумирање додавањем се заснива на претпоставци да дивергенција у било којој особини организма, која представља таксономски карактер, може представљати доказ раздвајања врста. Стога се у кумулативном маниру посматрају сви докази таксономског раздвајања који су добијени на основу испитиваних сетова карактера. Сва поклапања или одступања у дивергенцији ових сетова објашњавају се са еволуционог становишта, при чему се коначан таксономски закључак доноси на основу доступних доказа. Подударност сумираних доказа је пожељна, али не и обавезна, тако да нова врста може бити описана само на основу једног сета карактера уколико се тај сет сматра добрим индикатором раздвајања линија. Насупрот томе, сумирање подударањем претпоставља да постојање подударности у обрасцима дивергенције између неколико типова података представља доказ потпуног раздвајања врста. Предност овог приступа је у томе што промовише таксономску стабилност, с обзиром да већина таксонома прихвата валидност врста подржаних на основу подударности дивергенције у више различитих типова карактера. Међутим, процес специјације није увек праћен изменом стања карактера на свим нивоима, при чему постоји хетерогеност у релативној стопи промене карактера током раздвајања линија. С тим у вези, интегративни приступ заснован на подударности доказа, за разлику од сумирања додавањем, може узроковати потцењивање стварног броја врста услед немогућности да се детектују криптичне или младе врсте. Са друге стране, сумирање додавањем може довести до лажно позитивних резултата у раздвајању врста, који настају као резултат некритичке примене само једног типа доказа, као што је на пример локус митохондријског генома. Према томе, приликом доношења одлуке, у складу са таксономским питањем неопходно је сагледати све предности и недостатке оба интегративна приступа и размотрити испитиване карактере. Подударност дивергенције између различитих научних дисциплина сматра се јасним показатељем раздвајања врста и представља јачи доказ еволуционог обрасца у односу на примену само једне дисциплине (Schlick-Stainer, 2010).

2.2.2. Примена молекуларних маркера у таксономији

Традиционални таксономски приступ базиран на опису стања морфолошких карактера има ограничену примену у индентификацији врста, поготово у случајевима када је присутна фенотипска пластичност или морфолошки криптични таксони (Xiao и сар., 2010). Додатни изазов представља постојање израженог полног диморфизма и морфолошке различитости између развојних стадијума. Стога се, у оквиру интегративне таксономије, приступа анализи варијабилности са циљем откривања и описа постојећег диверзитета.

2.2.2.1. Митохондријски маркери и утврђивање врста путем ДНК баркодинга

Митохондријска ДНК (мтДНК) је због својих особина дуго представљана идеалним показатељем биолошке разноликости и као таква је интензивно коришћена у истраживању еволуционе и демографске прошлости врста и популација. Наиме, сматрано је да се мтДНК наслеђује искључиво клонално, по материнској линији и да стога не подлеже процесима рекомбинације. Додатно јој је приписивана готово неутрална еволуција, при чему је претпостављана приближно непроменљива стопа еволуционих промена, која се пореди са часовником. Митохондријска ДНК не представља функционално неутралан молекул, обзиром да садржи важне гене. Међутим, сматрало се да услед одсуства позитивне селекције, долази до акумулирања само неутралних и благо штетних мутација, тако да ниво дивергенције мтДНК у приближној мери одражава време раздвајања линија.

Сумирањем резултата спроведених студија показано је да митохондријски геном ипак не карактеришу наведене одлике (Ballard и Whitlock, 2004; Galtier и сар., 2009; Hill, 2020; Ghiselli и сар., 2021; Vaião и сар., 2023). Тако је установљено је да се рекомбинантни процеси у одређеној мери одвијају у мтДНК различитих организама и да као такви могу утицати на интерпретацију генеалогичке мтДНК, док је код представника мекушаца откривено двоструко унипарентално наслеђивање, које подразумева постојање две полно везане митохондријске линије — једна се наслеђује преко јајне ћелије, а друга преко сперматозоида (Ghiselli и сар., 2021). Такође је утврђено и присуство варијабилности у стопи мутације митохондријског генома, која се може разликовати чак и између две генетичке линије унутар исте врсте. Указано је и на могућност деловања селекције у форми фаворизовања адаптивно супериорнијих

мутација које поспешују стварање енергије за метаболичке процесе. Додатни извор позитивне селекције у еволуцији митохондрија представљају такозване себичне мутације. У питању су мутације које фаворизују пренос мтДНК варијанте на наредну генерацију, независно од утицаја који има на адаптивну способност домаћина. Осим тога, селекција може утицати и на мтДНК варијанте које су саме по себи неутралне, али је њихово наслеђивање повезано са другим генетичким елементима који се преносе по мајци. Тако да се у случају дејства позитивне селекције на ове елементе, узрокује повећање учесталости не само елемента који је под селекцијом, већ и мтДНК хаплотипа за који је везан (*енгл. hitch-hiking*). Још један узрочник промене у учесталости мтДНК хаплотипа представљен је унутарћелијским симбионтским микроорганизмима, као што су бактерије из рода *Wolbachia*. Присуство инфекције се наслеђује по мајци и потенцијално условљава ширење одређених мтДНК варијанти у популацији, што доводи до смањења интраспецијске варијабилности мтДНК. Поред тога, инфекција се може ширити путем хибридизације, када се бактерија заједно са митохондријским геномом пренесе са једне врсте на другу, при чему постојање јаке селекције за ширење ендосимбионта, може узроковати повећање учесталости интродуковане мтДНК у новој врсти, чак и у случају негативног утицаја на адаптивност домаћина услед умањене коадаптације са једарним генима. Овај процес представља интрогресију мтДНК посредовану ендосимбионтом (*енгл. endosymbiont-mediated mtDNA introgression*) и може узроковати присуство дељених мтДНК хаплотипова између различитих врста, што нарушава учинковитост митохондријских маркера (Klopfstein и сар., 2016; Gaunet и сар., 2019; Bruzese и сар., 2022). Међутим, и поред одступања од особина идеалног маркера, мтДНК, доказано, представља непроцењив алат у студијама молекуларног диверзитета.

Митохондријска ДНК се показала као изузетно користан алат у студијама интегративне таксономије. Наиме, 5' крај митохондријског гена за цитохром ц оксидазу I (COI) дужине 658 bp препознат је као баркод секвенца код животиња. Сама идеја ДНК баркодинга почива на примени кратке секвенце као универзалног показатеља припадности јединке одређеној врсти (Hebert и сар., 2003a, b; Kress и сар., 2015). Овакав приступ, односно анализа ДНК баркода је у великој мери унапредила таксономска истраживања и истраживања биолошке разноврсности уопште. Раздвајање јединки у групе на основу одређене граничне вредности генетичке дивергенције може указати на припадност посебним врстама. Код претходно неистражених група,

молекуларна дивергенција неретко представља основ за даљу анализу и примену додатних врста података у циљу утврђивања граница између врста и доношења целовитог таксономског закључка. Треба имати у виду да је раздвајање врста применом дивергенције ДНК секвенци могуће само уколико постоји јасна разлика молекуларног диверзитета унутар и између врста, што није случај код свих таксона. Тако је приступ ДНК баркодинга погоднији за испитивање група код којих су се врсте раздвојиле раније у прошлости и код којих је током времена дошло до фиксирања за врсту специфичних хаплотипова. Такође, еволуциони процеси као што су интрогресија, хибридизација и балансна селекција, могу довести до смањења разлике у дивергенцији мтДНК унутар и између врста, као и присуства дељених хаплотипова између различитих таксона и на тај начин нарушити поузданост изнетих закључака (Mutanen и сар., 2016). Поред тога, указано је на недостатак стандардизоване вредности дивергенције секвенци, која се првобитно примењивала у ДНК баркодинг приступу. Наиме, као показатељ јасног раздвајања врста узимана је вредност дивергенције секвенци од најмање 2% (Hebert, 2003b). Међутим, сагледавањем резултата истраживања спроведених на различитим редовима инсеката је утврђено да примена стандардизоване вредности дивергенције није омогућила успешну идентификацију 45% испитиваних врста (Cognato и сар. 2006). Тако је скоро у половини случајева дивергенција између врста мања од 2%, што при употреби стандардизоване граничне вредности од 2% резултује преклапањем диверзитета баркод секвенце унутар и између врста. Велики број научних студија додатно је потврдио проблематичност стандардизоване граничне вредности дивергенције баркод секвенци у одређивању граница врста (Dincă и сар., 2011; Huemer и сар., 2014; Pentinsaari и сар., 2014;; Astrin и сар., 2016; Weiss и сар., 2018; Hinojosa и сар., 2019; Sallokanel и сар., 2021), те је указано на потребу утврђивања вредности дивергенције за сваки генетички регион и таксон појединачно. Важно је напоменути да приступ ДНК баркодинга не представља замену традиционалној таксономији, те да коначан закључак о границама врста треба да буде заснован на примени додатних биолошких доказа и процени од стране таксономских стручњака. Узимајући у обзир могућност деловање еволуционих процеса на варијабилност COI гена, резултате ДНК баркодинга је у духу интегративне таксономије потребно сумирати са анализом других независних генетичких маркера, али и са морфолошким, географским или еколошким подацима, како би се врсте поуздано утврдиле.

Секвенца другог краја *COI* гена, односно његов 3' регион, заједно са ДНК баркодом представља први маркер избора у студијама молекуларног диверзитета осоликих мува, при чему је варијабилност оба региона *COI* гена, и поред потенцијалних недостатака, у великој мери допринела откривању и разумевању биолошке разноликости ове фамилије (Mengual и сар., 2006; Marcos-García и сар., 2011; Barkalov и Ståhls, 2015; Nedeljković и сар., 2015; Chroni и сар., 2017; Дан и сар., 2020; Nedeljković и сар., 2020; Vujić и сар., 2021b). Поред тога, још један митохондрисјки ген је препозат као алат од изузетног значаја у молекуларној систематици и филогенији инсеката. У питању је ген за цитохром б (енгл. *Cytochrome b*, *Cyt b*), који је због своје високе еволуционе стопе мутације и нивоа варијабилности, такође пронашао примену у разјашњавању статуса врста код различитих група организама (Kruštufek и сар., 2012; Nicolas и сар., 2012; Bonvicino и сар., 2014; Miranda и сар., 2016; Wang и сар., 2016; Kurina и сар., 2017; Jagielski и сар., 2018; Liu и сар., 2019; Caraballo и сар., 2020; Perera, и сар., 2022).

2.2.2.2. Митонуклеарна коадапација као механизам специјације

Раздвајање врста настаје као последица стварања баријере у протоку гена, при чему репродуктивна изолација може бити успостављена пре или након формирања зигота. Тако је постзиготски изолациони механизам представљен умањењем адаптивне способности новонасталих хибрида, која се може објаснити настанком митонуклеарне инкомпатибилности (Hill, 2017, 2019; Burton, 2022). Наиме, координисаност митохондријских и једарних гена који су укључени у процесе оксидативне фосфорилације (енгл. *Oxidative phosphorylation*, *OXPPOS*) је од есенцијалног значаја за функционисање организма. Шта више, показано је да варијабилност гена укључених у *OXPPOS* може бити последица адаптације ефикасности ћелијског дисања у односу на услове животне средине. Како би се одржала функционална координисаност коадаптираних гена, долази до коеволуције митонуклеарних скупова гена. Синхрона еволуција митохондријских и нуклеарних гена омогућава развој оптималних коадапација у изолованим популацијама, што може довести до специјације услед настанка митонуклеарне инкомпатибилности и формирања баријере у протоку гена између популација (Mishmar и сар., 2006; Hill, 2016, 2019; 2020). Као одговор на климатске услове, развијају се локалне адаптације, при чему смањена или прекинута

размена генског фонда додатно повећава дивергенцију популација. Као резултат настају популацији својствени митонуклеарни скупови гена, који приликом секундарног контакта воде смањеној адаптивној способности потомства услед генетичке инкомпатибилности, односно смањења функционалне координисаности између митохондријских и једарних гена ОХРНOS система (Lane, 2009; Hill, 2017).

Познато је да продукти митохондријских *COI* и *Cyt b* гена представљају важну компоненту електрон транспортног ланца и као такви учествују у стварању енергије која је неопходна за правилно одвијање метаболичких процеса у организму. Узимајући у обзир значај ових митохондријских гена, као и неопходност њихове симултане функционалности са деловима једарног генома, јасно је да се успешност примене ових гена као алата за разјашњавање граница врста може довести у везу са самом њиховом природом, као и улогом коју имају (Lane, 2015; Hill, 2016, 2017, 2019, 2020; Burton 2022).

2.2.2.3. Примена једарних рРНК гена и интергенских региона

Како би се смањила вероватноћа погрешног закључивања насталог услед недостатака примене митохондријских региона, у студије молекуларне таксономије се уводи анализа једарних маркера. Комбинација генетичких региона различитог порекла пружа поузданије утврђивање граница врста, као и расветљавање њихових филогенетских односа. Тако се у таксономији, систематици и филогенији осолик мува, молекуларна анализа митохондријских гена често примењује заједно са испитивањем секвенци једарних рРНК гена и њихових интергенских региона.

Гени за рибозомалну РНК се у једарном геному налазе у већем броју копија, при чему свака репетитивна јединица рДНК садржи гене који кодирају 28S рРНК, 18S рРНК и 5,8S рРНК, између којих се налазе некодирани региони, односно спејсери. Тако су 18S рРНК и 5,8S рРНК ген одвојени унутрашњим транскрибујућим спејсером 1 (енгл. *Internal transcribed spacer 1, ITS1*), док се између 28S рРНК и 5,8S рРНК гена налази унутрашњи транскрибујући спејсер 2 (енгл. *Internal transcribed spacer 2, ITS2*). Такође су и саме репетитивне јединице одвојене генетичким регионима, тако да се између 28S рРНК гена једног и 18S рРНК гена другог поновка налази интергенски спејсер (енгл. *Intergenic spacer, IGS*), кога чине два спољашња транскрибујућа (енгл.

External transcribed spacer, ETS) и један нетранскрибујући спејсер (енгл. *Non-transcribed spacer, NTS*).

Присуство генетичких региона са различитом стопом еволуције омогућава примену како рРНК гена, тако и њихових спејсера у реконструкцији филогеније на различитим таксономским нивоима. Тако 28S рРНК и 18S рРНК гени садрже домene од којих су неки високо варијабилни, док су други високо конзервативни, при чему се секвенце високо варијабилних домена користе у филогенији нижих таксономским категорија, као што су фамилије и родови. Сходно томе, анализа секвенци рРНК гена се често примењује у реконструкцији филогенетских односа осоликних мува на нивоу рода (нпр. Ståhls и Nyblom, 2000; Ståhls и сар., 2004; Massetti и сар., 2006; Mengual и сар., 2008; Reemer и Ståhls, 2013; Mengual и сар., 2015; Likov и сар., 2019; Veselić, 2018; Mengual и сар., 2020; Ståhls и сар., 2023). Са друге стране, секундарна структура ових гена се, због своје високе конзервативности, неретко примењује као маркер у испитивању дубљих филогенетских грана изнад нивоа реда. Треба имати у виду да рРНК гени еволуирају спорије од протеин кодирајућих региона, тако да ретко представљају први избор у молекуларној таксономији блиско сродних врста. Стога се приликом испитивања специјског диверзитета код осоликних мува, секвенце 28S рРНК и 18S рРНК гена углавном примењују као допуна анализи варијабилнијих генетичких региона, као што је *COI* ген (Chroni и сар., 2018; Radenković и сар., 2018; Šašić и сар., 2020; Vujić и сар., 2020b, 2021b). Насупрот томе, региони спејсера се, захваљујући вишој еволуционој стопи у односу на кодирајуће рРНК регионе, често користе у студијама на нивоу родова, врста и популација. Тако се секвенца *ITS2* региона показала као веома значајан маркер за раздвајање врста унутар различитих група инсеката, међу којима су и осолике муве (Haarto и Ståhls, 2014; Beebe, 2018; Nedeljković и сар., 2020; Zhang и сар. 2021; Ruiz-Arrondo и сар., 2023).

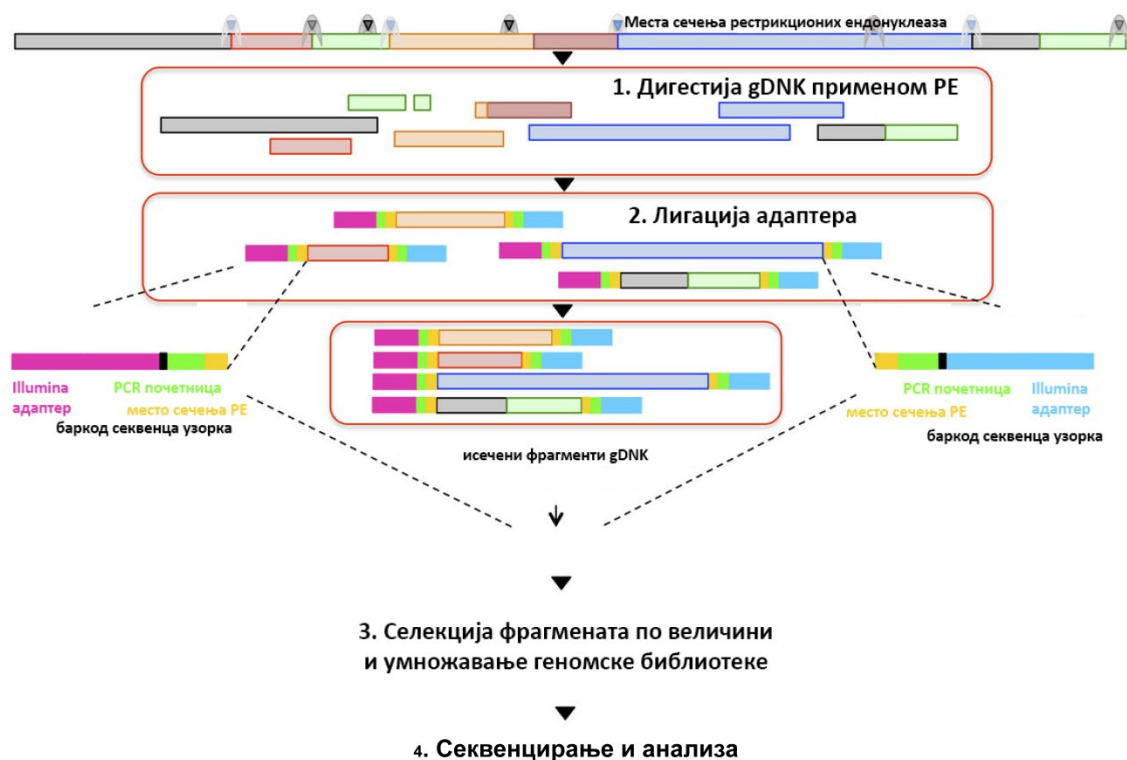
2.2.2.4. Примена геномских технологија и секвенцирања нове генерације (енгл. *Next-generation sequencing, NGS*)

Увођење анализе секвенци одабраних генетичких региона је у великој мери унапредило таксономска истраживања и допринело целовитијем разумевању биолошке разноврсности и филогенетских односа. Међутим, истраживања су претежно заснована на ограниченом сету молекуларних маркера и као таква су подложнија утицају различитих еволуционих процеса. Наиме, догађаји као што су хибридизација, интрогресија, хоризонтални трансфер гена, као и непотпуно раздвајање линија неретко воде настанку неподударности између испитиваних генетичких региона, што може узроковати потешкоће у реконструкцији филогеније и интерпретацији таксономских односа. Додатни изазов представља утврђивање статуса врста и њихових граница, које у оваквим случајевима остану непотпуно разјашњене и захтевају даља сагледавања, при чему су посебно захтевне групе и/или комплекси блиско сродних врста, код којих се специјација одиграла релативно скоро. Наиме, младе врсте услед непотпуног раздвајања линија могу садржати високу мутациону варијансу између испитиваних региона, што може отежати процену односа. Стога, поуздано разјашњавање таксономских питања и односа унутар проблематичних група захтева увођење нових маркера, који осликавају процесе еволуционе диференцијације у различитим деловима генома. Међутим, проналажење доследних и информативних маркера представља један од највећих изазова приликом истраживања диверзитета немодел организама (Schlötterer, 2004; Thomson и сар., 2008; Razkin и сар., 2016). Развојем геномских технологија и секвенцирања нове генерације (енгл. *Next-generation sequencing, NGS*), као и различитих геномских приступа, омогућена је анализа више стотина, па чак и хиљада маркера дистрибуираних широм генома, у односу на претходно доступне сетове од свега неколико генетичких региона. Са тим у вези, примена геномских технологија је умногоме допринела разумевању и опису биолошке разноликости, при чему у све већој мери представља својеврсну окосницу савремених студија молекуларног диверзитета.

Премда анализа секвенце комплетног генома пружа најсвеобухватнију слику, примена ове методе у студијама биодиверзитета је још увек ограничена високом ценом анализе по узорку. Стога се далеко чешће прибегава секвенцирању смањене

заступљености (енгл. *Reduced-representation sequencing, RRS*) које, уз знатно ниже трошкове и већу покривеност узорака, омогућава генерисање маркера дистрибуираних широм генома (Davey и сар., 2011; Peterson и сар., 2012; Andrews и сар., 2016). На тај начин се обухватају релативно велики, репрезентативни делови генома, који осликавају дејство различитих еволуционих догађаја, пружајући темељну основу у процени молекуларног диверзитета. Секвенцирање ДНК везано за рестрикциона места (енгл. *Restriction-site associated DNA sequencing, RAD-seq*) представља један од *RRS* приступа, чијом применом се читавају секвенце фрагмената око којих се налазе места сечења једног или више рестрикционих ензима (Peterson и сар., 2012). Ова методологија не захтева претходне информације о геному, те њена примена није ограничена само на организме са референтном геномском секвенцом, већ је погодна и за испитивање различитих група немодел организама, што омогућава изузетну предност у анализи биолошке разноврсности широког спектра екосистема (Andrews и сар., 2016).

Припрема геномске библиотеке се код првобитног *RAD-seq* протокола заснива на примени једног рестрикционог ензима са ретким местима сечења, уз комбинацију са накнадном насумичном фрагментацијом геномске ДНК у циљу генерисања кратких фрагмената који су погодни за секвенцирање на одговарајућим *NGS* платформама. Овим приступом настају ДНК фрагменти који на једном крају садрже циљано рестрикционо место, док је други крај настао насумичним исецањем процесом сонификације, тако да се за сваки *RAD* локус продукују фрагменти различите дужине. Насупрот томе, секвенционирање ДНК везано за дупла рестрикциона места (енгл. *Double digest restriction-site associated DNA, ddRAD-seq*) користи активност два различита рестрикциона ензима, чиме се замењује корак насумичне ДНК фрагментације. Применом пара ендонуклеаза, од којих једна препознаје високо а друга ниско заступљене нуклеотидне мотиве, омогућава се већа покривеност, као и униформност у дужини фрагмената који потичу са истог локуса. Дигестија геномске ДНК је додатно праћена прецизним одабиром фрагмената одговарајуће дужине за секвенцирање, тако да се из анализе искључују региони окружени веома блиским или веома удаљеним местима препознавања рестрикционих ензима. Затим се лигацијом олигонуклеотидних адаптера и почетница, уз једнозначно обележавање ДНК фрагмената сваког узорка, омогућава даља припрема библиотеке за секвенцирање на некој од одговарајућих *NGS* платформи (Слика 1).



Слика 1. Шематски приказ корака у примени методе секвенцирања везаног за дупла рестрикциона места (енгл. *Double digest restriction-site associated DNA, ddRAD-seq*). PE — рестрикционе ендонуклеазе.

Највећи недостатак свих *RAD-seq* техника огледа се у могућем присуству полиморфизма унутар места препознавања рестрикционих ензима, што резултује неуспелим исецањем геномске ДНК на том месту и самим тим изостанком секвенцирања и генотипизације у *RAD* локусу (Andrews и сар., 2016). Са тим у вези, полиморфна рестрикциона места могу довести до феномена познатог као *allelic dropout*, који се услед присуства нултог алела (алела са мутацијом у месту препознавања рестрикционих ензима) манифестује у виду погрешне интерпретације хетерозиготне јединке као хомозигота за дати локус. Додатно може доћи и до потпуног изостанка генотипизације одређених *RAD* локуса, уколико јединка садржи само алеле са измењеним рестрикционим местом и/или местима. Показано је да учесталост измењених рестрикционих места и нултих алела расте са нивоом укупне варијабилности унутар изучаваног система. Сходно томе, са повећањем генетичке дистанце између анализираних јединки, може доћи и до смањења у броју ортологних локуса, чиме се нарушава ефикасност *RAD-seq* техника за процену односа између удаљених врста. Међутим, симулираним експериментом спроведеном на 12 генома

различитих врста рода *Drosophila*, са временом дивергенције у распону од 5 до 63 милиона година, подаци добијени *RAD-seq* методом омогућили су успешну реконструкцију претходно познате филогеније *Drosophila*, пружајући снажну статистичку подршку како скоријим раздвајањима, тако и чворовима који осликавају дубљу еволуциону скалу и хронолошки удаљене догађаје (Cariou и сар., 2013). Након тога је велики број студија додатно доказао корисност *RAD-seq* метода као поузданог алата за процену филогеније, указујући на моћ овог геномског приступа да успешно реконструише добро познате филогенетске односе на различитим таксономским нивоима (Ebel и сар., 2015; Manthey и сар., 2016; Razkin и сар., 2016; Rodríguez и сар., 2017; Lecaudey и сар., 2018).

Припрема *RAD-seq* библиотека захтева одређену количину геномске ДНК доброг квалитета и високе молекуларне масе, што није увек могуће добити из претходно сакупљеног материјала. Додатно, разлике у лабораторијским условима, као и самим платформама за секвенцирање могу довести до проблема приликом интеграције нових узорака у претходно генерисане *RAD* податке. Потенцијална варијација у секвенцираним фрагментима, односно генотипизација различитих локуса отежавају сумирање различитих студија, као и проширење претходно генерисаног *RAD* сета података у циљу истраживања додатних таксона или свеобухватнијих филогенетских односа (Andrews и сар., 2016).

Поред недостатака који се огледају у смањеној поновљивости и могућем присуству полиморфизма унутар места препознавања рестрикционих ензима, *RAD-seq* методе су се доказале као молекуларни алат од изузетног значаја у студијама молекуларне таксономије које за циљ имају утврђивање јасних граница и евалуацију статуса врста (Kozlov и сар., 2017; Dupuis и сар., 2018; Ivanov и сар., 2018; Dincă и сар., 2019; Kornilios сар., 2019; Rancilhas и сар., 2019; Sihvonen и сар., 2020; Glon и сар., 2021; Říčan и сар., 2021; Salokannel и сар., 2021; Dong и сар., 2022; Kim и сар., 2022; Dianat и сар., 2023; Ivanov и сар., 2023), као и у процени филогенетских односа на нивоу рода (Reyes-Velasco и сар., 2018; Léveillé-Bourret и сар., 2019; Prous сар., 2020; Gutiérrez-Rodríguez и сар., 2021; Ortiz и сар., 2021; Comito и сар., 2022; Uhrová и сар., 2022; Dvoyashov и сар., 2023; Secci-Petretto и сар., 2023).

3. Циљеви

Имајући у виду да *Merodon ruficornis* групу еволуционо блиских и морфолошки сличних врста одликује изузетан специјски диверзитет, као и значајно присуство локалних ендема са ограниченом дистрибуцијом, који су као такви осетљиви на промене у екосистему, истиче се потреба за очувањем свеукупне разноврсности ове групе. Међутим, недостатак доследних и поузданих маркера са одговарајућим степеном резолуције умногоме отежава сагледавање постојећег диверзитета и утврђивање јасних таксономских граница, чиме би се омогућило прецизно дефинисање еволуционо значајних јединица. Према томе је у анализу неопходно увести молекуларне алате који пружају свеобухватну и темељну основу за проучавање диверзитета и разјашњавање таксономских и еволуционих односа унутар изазовних комплекса и група.

У оквиру ове дисертације сагледана је варијабилност пет одабраних митохондријских и једарних региона (3' и 5' регион *COI* гена, регион *Cyt b* гена, *D2-3* експанзивни регион *28S* рРНК гена и *ITS2* регион), као и сета *ddRAD-seq* геномских података дистрибуираних широм генома, са следећим циљевима:

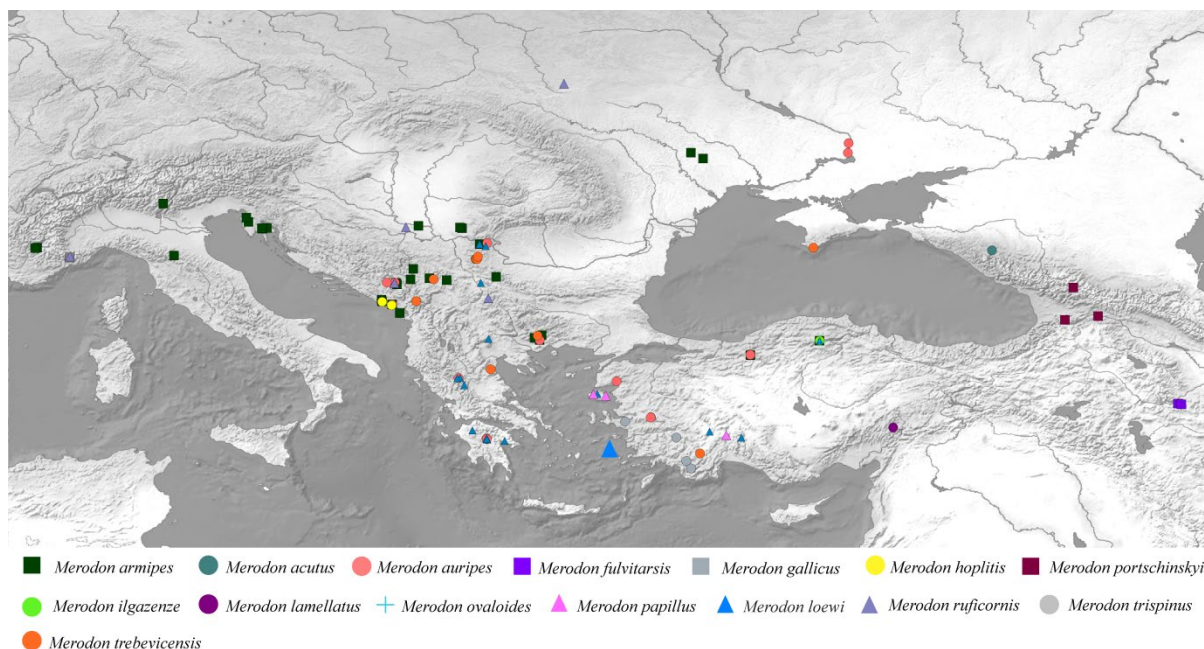
- Одређивање генетичког диверзитета унутар и између врста у оквиру *M. ruficornis* групе применом постојећих и развојем нових молекуларних алата од значаја, чиме ће се омогућити целовито разумевање разноврсности ове групе.
- Решавање таксономског статуса врста унутар *M. ruficornis* групе. Како су досадашње студије, засноване на сету од свега неколико генетичких маркера ограничене информативности, указале на континуирано неслагање између различитих типова података, статус одређених таксона захтева даљу процену. Са тим у вези, очекује се да ће увођење у анализу нових молекуларних алата, као и маркера који осликавају еволуционе процесе унутар различитих делова генома, омогућити идентификацију врста и разјашњење таксономских нелогичности.
- Одређивање утицаја срединских фактора на обликовање генетичког диверзитета *M. ruficornis* групе. Узимајући у обзир значајну улогу еколошких процеса у дистрибуцији и диверзификацији *M. ruficornis* групе, може се претпоставити да

генетички диверзитет ове групе у одређеној мери представља резултат хетерогености срединских услова.

4. Материјал и методе

4.1. Материјал

Сагледавање молекуларног диверзитета извршено је анализом варијабилности одабраних региона митохондријског и једарног генома на узорку од 241 јединке које обухватају 15 различитих врста из *M. ruficornis* групе (Табела П1). Додатни увид у генетичку разноврсност групе омогућен је применом *ddRAD-seq* у циљу испитивања маркера дистрибуираних широм генома код укупно 92 јединке из 12 различитих *M. ruficornis* врста. Материјал је сакупљан у периоду од 2008. до 2022. године у оквиру теренских истраживања чланова Лабораторије за истраживање и заштиту биодиверзитета, Департмана за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду, при чему су јединке сакупљене на укупно 94 локалитета са територије Црне Горе, Хрватске, Грчке, Грузије, Француске, Ирана, Италије, Немачке, Републике Северне Македоније, Русије, Словеније, Србије, Турске и Украјине (Слика 2). Испитивани материјал претежно представља део збирке FSUNS, која припада Природно-математичком факултету у Новом Саду, док се примерци из Ирана чувају у оквиру колекције Khaghaninia Samad у Ирану.



Слика 2. Област узорковања врста из *Merodon ruficornis* групе са означеним локалитетима узорковања.

4.2. Методе

4.2.1. Изолација геномске ДНК

Почетни корак у испитивању молекуларног диверзитета *M. ruficornis* групе подразумевао је изолацију геномске ДНК из ткива сакупљених јединки. Протокол изолације је, уз одређене измене, пратио претходно развијену методу засновану на натријум додецил сулфату (енгл. *sodium dodecyl sulfate*, *SDS*) коју је 2010. године описао Chen са сарадницима, или се базирао на употреби комерцијалног комплета NucleoSpin Tissue DNA Extraction kit (Marchery-Nagel, Дирен, Немачка), следећи упутства произвођача.

4.2.1.1. Протокол изолације целокупне геномске ДНК применом *SDS* методе

Изолација је започета уситњавањем ткива средње и задње ноге осоликних мува, уз додаток 500 μ l *SDS* дигестиционог пуфера (0,5% (w/v) *SDS*, 200 mM Tris, 25 mM EDTA, 250 mM NaCl), при чему су механичка разградња ткива и компоненте коришћеног пуфера симултано подстицале лизу ћелија и самим тим ослобађање молекула ДНК. Наиме, *SDS*, као ањонски детерцент има улогу у разградњи ћелијске мембране, трис(хидроксиметил)амниометан хидрохлорид (TrisHCl) одржава оптималну рН вредност, затим етилендиаминтетрасирћетна киселина (EDTA) везује јоне магнезијума и тиме инхибира деловање активности већине ДНаза, док натријум хлорид (NaCl) утиче на очување структуре ДНК молекула и одстрањивање протеина. У наредном кораку садржај сваке кивете је благо промешан на вортексу, а затим је са циљем оптимизације хемијских услова за деградацију ћелија и ткива, вршена инкубација на 37°C током сат времена. Након почетног дела инкубације је у сваку кивету додато 10 μ l раствора протеиназе К (20 mg/ml) и инкубарање је настављено на 50°C у периоду од једног сата. Следила је екстракција добијеног хомогената помоћу смеше фенол/хлороформ/изоамил алкохола (25:24:1) и центрифугирање узорака на 12 000 g у трајању од 10 минута. Горња водена фаза је пажљиво пребацивана у нову стерилну кивету запремине 1,5 ml, а затим је екстракција поновљена са 240 μ l хлороформ/изоамил алкохола (24:1). Наредни корак је подразумевао преципитацију ДНК додавањем 500 μ l хладног апсолутног етанола, уз центрифугирање на 12 000 g при температури од 4°C, током 15 минута. Како би се уклонили остаци соли, настали талог је два пута испиран са 150 μ l 70% хладног етанола уз поновно центрифугирање

при истим условима у трајању 3 минута. Преципитат је сушен на 37°C до потпуног испаравања етанола, а потом растворен у 0,1 x ТЕ пуферу (pH 8) запремине од 30 до 40 μ l.

4.2.1.2. Протокол изолације целокупне геномске ДНК применом *NucleoSpin Tissue DNA Extraction kit* комерцијалног комплекта

Изолација геномске ДНК је, као и код претходно описане *SDS* методе, започета уситњавањем ткива средње и задње ноге осолених мува, уз додатак 180 μ l дигестиционог пуфера (Marchery-Nagel, Дирен, Немачка). Затим је у сваку кивету кивету додато 25 μ l раствора протеиназе К (20 mg/ml) (Marchery-Nagel, Дирен, Немачка), након чега је садржај благо промешан на вортексу и инкубиран током ноћи при температури од 56°C. У наредном кораку су узорци најпре благо промешани на вортексу, а потом је у сваку кивету додато 200 μ l дигестиционог пуфера В3 (Marchery-Nagel, Дирен, Немачка). Садржај сваке кивете је поново промешан на вортексу и затим инкубиран на 70°C у трајању од 10 минута. Наредни корак је подразумевао преципитацију ДНК додавањем 210 μ l хладног апсолутног етанола, након чега је за сваки узорак следило пажљиво пребацивање укупног преципитата у колоницу са мембраном (*NucleoSpin® Tissue Column*) која има за циљ везивање преципитиране ДНК и постављена је у кивети запремине 2 ml (*Collection Tube*). Следило је центрифугирање узорка на 11 000 g у трајању од једног минута. Садржај *Collection Tube* је одливен, након чега је додато 500 μ l пуфера за испирање ВW (Marchery-Nagel, Дирен, Немачка) и узорци су током једног минута центрифугирани на 11 000 g, чиме је омогућено уклањање остатака соли. Садржај *Collection Tube* је одливен, а корак испирања је поновљен додатком 600 μ l пуфера В5 (Marchery-Nagel, Дирен, Немачка) и центрифугирањем узорка при истим условима. Како би се остаци етанола уклонили са мембране унутар колонице, узорци су, након одливања садржаја *Collection Tube*, још једном центрифугирани. Завршни корак је подразумевао ресуспензију ДНК у ВЕ пуферу за елуирање (5 mM Tris/HCl, pH 8.5) (Marchery-Nagel, Дирен, Немачка).

4.2.1.3. Утврђивање концентрације и чистоће изоловане ДНК

Концентрација изоловане ДНК је одређена мерењем апсорбанце раствора на 260 nm помоћу BioSpec-nano спектрофотометра (Shimadzu, Јапан), док је утврђивање чистоће узорака изражено кроз однос апсорбанци на 260 и 280 nm (A_{260}/A_{280}), као и на 260 и 230 nm (A_{260}/A_{230}). Међутим, спектрофотометри нису специфични у погледу разликовања да ли уочена апсорбанца на 260 nm потиче од геномске ДНК или пак од других молекула као што су РНК и једноланчана ДНК. На мерење такође могу утицати слободни нуклеотиди и соли. Стога присуство различитих молекула у изолату може у одређеној мери резултовати увећањем спектрофотометријски измерене концентрације ДНК молекула. Како припрема геномске библиотеке током *ddRAD-seq* протокола захтева прецизно измерену количину геномске ДНК, поред мерења апсорбанце, приступило се и флуориметријској методи одређивања концентрације ДНК употребом QFX флуорометра (DeNovix, Вилмингтон, Делавер, Сједињене Америчке Државе). Предност овог приступа заснива се на прецизности, насталој као резултат коришћења флуоресцентних реагенаса који се специфично везују за молекул ДНК, те емитују сигнал који уређај детектује и читава у виду вредности ДНК концентрације. Двострука провера ДНК концентрације извршена је код узорака чији је молекуларни диверзитет анализиран *ddRAD-seq* методом. Додатно је код ових узорака електрофоретски испитана целовитост изоловане ДНК. У ову сврху је припремљен 0,8 % агарозни гел употребом 1xTBE пуфера (0,1М тризма база, 0,1М борна киселина, 0,05М EDTA). Електрофореза је текла при сталном напону од 100 V, након чега је у присуству Roti-GelStain (Carl Roth GmbH, Немачка) боје изведена визуализација ДНК под ултраљубичастим (енгл. *ultraviolet*, UV) светлом.

4.2.2. Анализа молекуларних маркера

Један од циљева ове дисертације јесте примена постојећих и развој нових молекуларних алата за утврђивање диверзитета и таксономских односа унутар *M. ruficornis* групе. С тим у вези је одабран сет митохондријских и једарних региона, као и *ddRAD-seq* методологија, која пружа могућност анализе хиљаде маркера дистрибуираних широм генома.

4.2.2.1. Реакције умножавања и секвенцирања митохондријских и једарних региона

Анализирана је полиморфност пет генетичких региона, од чега се три налазе унутар митохондријског генома (3' и 5' крај *COI* гена, заједно са регионом *Cyt b* гена), док су два представљена једарним секвенцама (*D2-3* експанзивни регион једарног *28S* рРНК гена, као и унутрашњи *ITS2* регион).

Испитивани региони су умножени ланчаном реакцијом полимеразе (енгл. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) помоћу Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler, Eppendorf Personal Thermocycler и Applied Biosystems MiniAmp Plus Thermal Cycler апарата. Између 50 и 100 ng геномске ДНК је коришћено као матрица за реакцију умножавања са 5 pmol сваке од почетница, 0,1 mM сваког нуклеотида, 1x PCR Таq пуфера (ThermoScientific, Литванија) и 1,25 U Таq полимеразе (ThermoScientific, Литванија) у укупној запремини од 25 μ l. Реакција се код проблематичних узорака са веома ниском концентрацијом ДНК одвијала у присуству 1x Dream Таq пуфера (ThermoScientific, Литванија) и 1,25 U Dream Таq полимеразе (ThermoScientific, Литванија), као ензима веће специфичности чијим се деловањем поспешује амплификација. Умножавање *ITS2* региона и 3' краја *COI* гена подразумевало је почетно раздвајање ланаца на 95°C током 2 минута, потом 29 циклуса од којих сваки обухвата раздвајање ланаца (30 секунди, 94°C), везивање почетница са матрицом на основу комплементарности (30 секунди, 49°C) и синтезу ДНК ланца (2 минута, 72°C). Завршним кораком је на 72°C изведена финална синтеза ДНК ланца у трајању од 8 минута. Секвенце *D2-3* региона *28S* рРНК гена и 5' краја *COI* гена и региона су умножене праћењем протокола који чине: иницијално раздвајање ланаца на 94°C у трајању од 3 минута, затим 29 циклуса са фазама раздвајања ланаца (30 секунди, 94°C), везивања почетница (30 секунди, 49°C) и синтезе ДНК ланца (2 минута, 72°C). Након последњег циклуса следила је завршна синтеза ДНК ланца на 72°C током 8 минута. Реакција умножавања *Cyt b* генског региона састојала се од троминутног почетног раздвајања ланаца на температури од 94°C, следило је 29 циклуса сачињених из три фазе: раздвајање ланаца (30 секунди при 94°C), везивање почетница (30 секунди, 45°C) и синтеза ДНК ланца (2 минута, 72°C). Потом је реакција завршена финалном екстензијом на 72°C у периоду од 8 минута. Нуклеотидне секвенце и називи почетница, које су употребљене током реакција умножавања и секвенцирања анализираних генетичких региона су приказане у Табели 1.

Табела 1. Нуклеотидне секвенце и називи почетница коришћених за умножавање одабраних митохондријских и једарних региона код инсеката.

	Почетница	Секвенца почетнице	Извор
5' COI регион	LCO-1490	5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3'	Folmer и cap., 1994
	HCO-2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	
3' COI регион	C1-J2183 (alias Jerry)	5'-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3'	Simon и cap., 1994
	TLN2-N-3014 (alias Pat)	5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'	
Cyt b ген	CB-J10933	5' -GTTTTACCTTGAGGACAAATATC-3'	Simon и cap., 1994
	CB-N-11328	5' -AGCAAATAAAAAATATCATTC-3'	
D2-3 регион 28S rRNK гена	28S(F2)	5-AGAGAGAGTTCAAGAGTACGTG-3'	Belshaw и cap., 2001
	28S(3DR)	5'-TAGTTCACCATCTTTCGGGTC-3'	
ITS2 регион	ITS2a	5'-TGTGAACTGCAGGACACAT-3'	Beebe и Saul, 1995
	ITS2b	5'-TATGCTTAAATTCAGGGGGT-3'	

Успешност амплификације испитиваних маркера утврђена је електрофоретском визуализацијом продуката на 1,5% агарозном гелу, при сталном напону од 140 V. Приближна дужина умножених продуката је одређена на основу GeneRuler 100 bp (ThermoScientific, Литванија) маркера. Електрофореза се одвијала у 1xTBE пуферу док је присуство боје Roti-GelStain (Carl Roth GmbH, Немачка) омогућило читавање добијених фрагмената помоћу УВ транслуминатора.

Успешно умножени продукти су даље подвргнути пречишћавању употребом ензима егзонуклеазе I и термосензитивне алкалне фосфатазе (ThermoScientific, Литванија), са циљем уклањања неискоришћених почетница и нуклеотида које могу утицати на појаву нејасног сигнала приликом секвенцирања. Након пречишћавања,

секвенце анализираних региона су продуковане у једном смеру употребом *forward* почетнице. За реакцију Сангеровог секвенционирања коришћене су услуге европског одељења компаније Macrogen, са седиштем у Амстердаму (Холандија).

4.2.2.2. Припрема геномске *ddRAD-seq* библиотеке са секвенционирањем

Почетни корак у припреми *ddRAD-seq* геномске библиотеке подразумева утврђивање концентрације укупне ДНК, након чега следи нормализација, односно процес разблаживања изолата у циљу постизања подједнаке концентрације код свих испитиваних узорака. На овај начин се омогућава смањење варијације у количини очитаних секвенци између узорака. Наредни корак је обухватао исецање геномске ДНК ендонуклеазама SphI и MboI (New England BioLabs, Велика Британија), чијом активношћу настају ДНК фрагменти са једноланчаним крајевима — такозвани лепљиви крајеви. Методологија *ddRAD-seq* приступа занима се на употреби два рестрикциона ензима са различитом заступљеношћу места сечења у геному, тако да један ензим прави чешће, а други ређе прекиде унутар испитиване ДНК. Одабир рестрикционих ензима базиран је на процењеној величини генома испитиваних врста. Укупан волумен реакционе смеше је износио 30 μ l и садржао је 300 ng геномске ДНК, као и 2,4 U сваке од ендонуклеаза. Процес дигестије је текао у присуству CutSmart пуфера (New England BioLabs, Велика Британија) и састојао се из инкубације у две фазе. Прва је подразумевала период реакције коришћених ендонуклеаза при температури од 37°C у трајању од 90 минута, након које је следила инактивација ензима инкубацијом на 65°C у трајању од 20 минута. Потом је активност T4 ДНК лигазе (New England BioLabs, Велика Британија) употребљена са циљем везивања адаптера за крајеве генерисаних ДНК фрагмената. Адаптери представљају олигонуклеотиде који су једним крајем комплементарни секвенци сечења коришћених ендонуклеаза и у свом саставу садрже баркод, односно секвенцу која једнозначно одређује сваки од анализираних узорака. Захваљујући баркод региону омогућено је касније биоинформатичко разврставање секвенци и одређивање јединке из чијег су генома прочитане. Лигација адаптера је извршена у 3 корака. Током 60 минута су узорци инкубирани на 23°C, потом 60 минута на 20°C и на крају 20 минута при температури од 65°C у циљу инактивације коришћене ДНК лигазе. Процес се одвијао у запремини од 50 μ l, са 180 U T4 ДНК лигазе, затим 2,5 pmol једног и 5 pmol

другог адаптера. Након лигације адаптера, приступа се коначном сједињавању узорака у заједничку смешу, која се затим пречишћава 1,5 X AMPureXP перлама (Beckman Coulter Life Sciences, Сједињене Америчке Државе) у циљу уклањања лигазе и рестрикционих ензима. Затим је помоћу апарата BluePippin (Sage Science, Сједињене Америчке Државе) извршен одабир фрагмента величине од 380 bp до 600 bp, који су коришћени у даљој анализи. Одабрани фрагменти су подвргнути ланчаној реакцији полимеразе током које су за њих везане почетнице које садрже место везивања за Illumina проточну ћелију (*енгл. flow cell*). Приликом умножавања коришћен је Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (New England BioLabs, Велика Британија) и реакција волумена 50 µl је започета почетним раздвајањем ланаца на 95°C током 3 минута. Следило је 10 циклуса, од којих сваки обухвата раздвајање ланаца (30 секунди на 95°C), везивање почетница (30 секунди, 60°C) и синтезу ДНК ланца (45 секунди, 72°C). Након последњег циклуса, следила је завршна екстензија на 72°C у трајању од 2 минута. Продукти реакције су потом пречишћени са 1 X AMPureXP перлама (Beckman Coulter Life Sciences, Сједињене Америчке Државе). Квалитет за добијене геномске библиотеке је проверен применом Qubit 2.0 флуорометра (Invitrogen, Сједињене Америчке Државе), као и Bioanalyzer DNA есеја (Agilent technologies, Сједињене Америчке Државе).

Очитавање секвенци геномских библиотека спроведено је у оба смера током 150 циклуса (150 bp *paired-end*) на NovaSeq 6000 апарату следећи упуста произвођача (Illumina, Сједињене Америчке Државе). Услуге припреме геномске библиотеке и секвенционирања спроведене су од стране компаније IGA Technology Services из Удина, Италија.

4.2.3. Утврђивање присуства *Wolbachia* инфекције

Провера присуства бактеријског ендосимбионта из рода *Wolbachia* је рађена код одабраних представника врста из *M. ruficornis* групе. Инфекцију је могуће утврдити анализом присуства бактеријског генома у укупној ДНК из узорака осолених мува. Према томе, користећи претходно изоловану геномску ДНК као матрицу, умножаван је регион 16S рРНК гена бактерије, након чега је продукт реакције проверен електрофорезом на 1,5% агарозном гелу. Ланчана реакција полимеразе се одвијала у присуству 1 x PCR Таq пуфера (ThermoScientific, Литванија), 1,5 mM MgCl₂, 0,25 mM

сваког нуклеотида, 1,25 U Таq полимеразе (ThermoScientific, Lithuania), 7 pmol сваке од почетница, 50-100 ng геномске ДНК и воде високе чистоће додате ради остваривања укупне запремине од 25 µl. Током умножавања коришћене су почетнице специфичне за регион 16S рРНК гена код бактерија из рода *Wolbachia* (Werren и Windsor, 2000): Wspecf (5'-САТАССТАТТЦГААГГГГАТАГ-3') и Wspecr (5'-АГСТТЦГАГТГААССААТТС-3'). Почетно раздвајање ланаца текло је на температури од 95°C у трајању од 2 минута, а затим је следило једноминутно везивање почетница при 60°C и синтеза ДНК ланца на температури од 72°C током једног минута. Наредни корак обухватио је 35 циклуса, од којих се сваки састојао из три фазе: раздвајање ланаца (30 секунди, 95°C), везивање почетница (1 минут, 60°C) и синтеза ДНК ланца (45 секунди, 72°C). Последњи корак је био завршна синтеза ДНК ланаца на 72°C у трајању од 5 минута. Остаци неискоришћених почетница и нуклеотида у реакцији су уклоњени активношћу ензима егзонуклеаза I и термосензитивне алкалне фосфатазе (ThermoScientific, Литванија), након чега су умножени фрагменти секвенцирани у једном смеру употребом *forward PCR* почетница. Услуге секвенцирања су спроведене од стране одељења компаније Macrogen у Амстердаму (Холандија).

4.2.4. Статистичка анализа резултата

4.2.4.1. Обрада нуклеотидних секвенци умножених генетичких региона од интереса

Квалитет нуклеотидних секвенци добијених у процесу секвенцирања проверен је прегледом хроматограмских записа у оквиру програмског пакета *BioEdit 7.2.5* (Hall, 1999), при чему је за секвенце са јасним хроматографским пиковима сматрано да су задовољавајућег квалитета, те су укључене у формирање матрица сваког од испитиваних генетичких региона. Секвенце су по потреби додатно кориговане уколико су уочене грешке у читавању пикова унутар хроматограмских записа. Након провере квалитета, приступило се поравнању матрица секвенци (*енгл. alignment*). Анализиране матрице митохондријских протеин кодирајућих гена не садрже нуклеотидне празнине (*енгл. gap*) настале мутацијама типа инсерција и делеција (*енгл. insertion-deletion, indel*), што је омогућило мануелно поравнање секвенци. Насупрот томе, поравнање секвенци једарних региона захтевало је другачији приступ, услед присуства празнина унутар

испитиваних матрица. Стога су секвенце *D2-3* региона *28S* рРНК гена поравнате применом *G-INS-i* стратегије унутар програмског пакета *MAFFT 7* (Kato и Standley, 2013). Одабрана стратегија претпоставља могућност поравнања читавог региона захваљујући присуству сличности на нивоу читаве секвенце. Са друге стране, *ITS2* регион одликује виши ниво варијабилности и са тим у вези је за поравнање секвенци одабран *E-INS-i* присуп који претпоставља присуство дугих празнина и вишеструких конзервираних домена (Kato и сар., 2009).

У циљу испитивања полиморфности које су настале као резултат инсерција и делеција, празнине унутар поравнања једарних региона су преведене у бинарни запис применом програмског пакета *FastGap 1.2* (Borchsenius, 2004). Употребљени алгоритам се заснива на методи једноставног превођења празнина (Simmons и Ochoterena, 2000) који инделе са заједничком почетном и крајњом позицијом унутар поравнатих секвенци преводи у матрицу бинарних карактера, при чему 1 представља присуство, а 0 одсуство празнине (Simmons и Ochoterena, 2000). Пошто је немогуће утврдити да ли је краћи индел присутан унутар дужег, индели који спадају у опсег дужег су кодирани као непозната знаковна стања. Добијене матрице бинарних карактера су придодате нуклеотидним поравнањима једарних региона ради даље анализе.

4.2.4.2. Израчунавање параметара молекуларног диверзитета

Хаплотипови и генотипови испитиваних генетичких региона дефинисани су применом програмског пакета *DnaSP 6* (Rozas и сар., 2017), при чему се одређивању *28S* рРНК и *ITS2* генотипова приступило на два начина: 1) анализом ДНК секвенци, третирајући нуклеотидне празнине настале инсерцијама и делецијама као непостојеће податке (енгл. *missing data*); и 2) анализом нуклеотидних секвенци заједно са инделима који су препознати као пето стање унутар секвенце. Исти програмски пакет *DnaSP 6* је употребљен при израчунавању основних параметара диверзитета нуклеотидних секвенци, као и полиморфности која је настала утицајем инсерција и делеција. За сваки од анализираних региона, одређен је број полиморфних позиција (S), број хаплотипова/генотипова (h/g), диверзитет хаплотипова/генотипова (Hd/Gd), просечан број нуклеотидних разлика (K) и диверзитет нуклеотида (π). Услед присуства инсерција и делеција, за *28S* рРНК ген и *ITS2* регион израчунати су и следећи параметри молекуларног диверзитета: број индела (I), број генотипова дефинисаних на

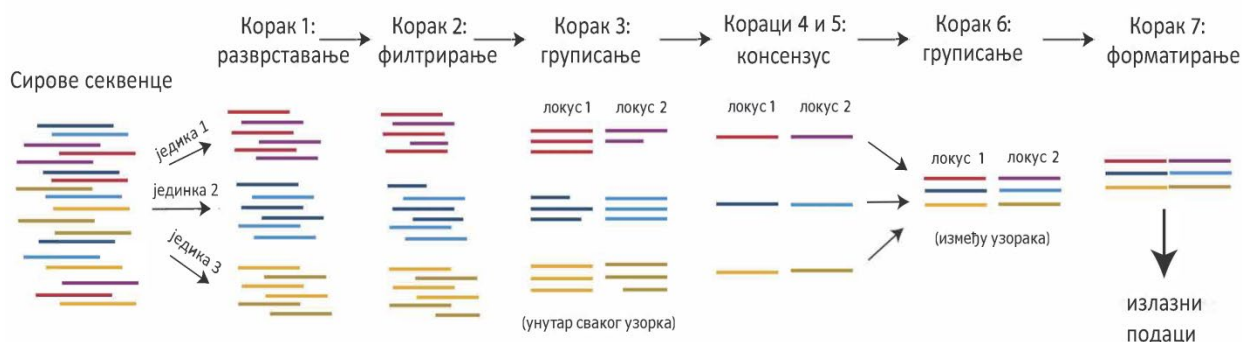
основу индела ($g(i)$), као и диверзитет одређених генотипова ($Gd(i)$), диверзитет индела ($K(i)$) и диверзитет индела по позицији ($\pi(i)$). Мреже хаплотипова анализираних митохондријских гена су конструисане применом *Median-joining* методе (Bandelt и сар., 1999) у оквиру програмског пакета PopART (Leigh и Bryant, 2015). Како програм PopART нема могућност анализе позиција са нуклеотидним празнинама (*енгл. gap*) или позиција са двосмисленим карактерима (нпр. $?$, N , Y , R), пре конструкције мрежа заснованих на варијабилности *28S* и *ITS2* једарних маркера, сетови секвенци су модификовани тако да у анализу буду укључене и *gap* позиције које су у свим секвенцама замењене идентичним нуклеотидом, а који се не појављује у секвенцама које на истој позицији не садрже *gap*. На овај начин је омогућено сагледавање односа између генотипова заснованих на варијабилности нуклеотидних секвенци заједно са инделима који су препознати као пето стање унутар секвенце. Некоригована вредност дивергенције секвенци (p дистанца), као и најбољи модел базне супституције анализираних секвенци, одређени су у оквиру програмског пакета *MEGA X* (Kumar и сар., 2018). Приликом одабира супституционог модела, коришћен је Акаике информациони критеријум (AIC) (Akaike, 1974).

4.2.4.3. Биоинформатичка обрада и филтрирање добијених *ddRAD-seq* података

Први корак у биоинформатичкој анализи *ddRAD-seq* података подразумева разврставање и одређивање квалитета продукованих нуклеотидних секвенци. Стога су командом *process_radtags* у оквиру софтвера *Stacks 2.61*, сирове секвенце разврстане, односно додељене узорку из чијег су генома прочитане, а затим су са краја секвенци уклоњени нуклеотидни низови настали читавањем коришћених адаптера и почетница, тако да укупна дужина секвенци буде 135 база. Квалитет добијених секвенци је процењен унутар софтвера *FastQC 0.11.8* на основу вредности оцене квалитета (*енгл. Phred quality score, Q*) која представља десетоструку вредност негативног декадног логаритма вероватноће за грешку. Нуклеотидне позиције са Q вредношћу већом од 20, односно са вероватноћом за грешку од максималних 1% су сматране задовољавајућег квалитета. Применом софтвера *ipyrad 0.9.5* (Eaton и Overcast, 2020) су из даље анализе уклоњене секвенце које садрже више од 5 нуклеотидних позиција недовољног квалитета (са Q вредношћу мањом од 20).

Један од изазова у истраживању генетичког диверзитета немодел организама, огледа се у одсуству информација о геному. Стога су, услед непостојања референтног генома анализираних и / или сродних врста, очитане секвенце склапане *de novo* унутар софтвера *ipyrad* 0.9.5 (Eaton и Overcast, 2020). Треба имати у виду да применом *de novo* приступа није могуће одредити да ли анализирани регион потиче са једарног или митохондријског генома, али да се, с обзиром на веома малу величину митохондријског генома у односу на једарни, може закључити да региони једарног генома вероватније чине већи удео испитиваних *ddRAD* секвенци. Сам процес подразумева седам корака груписања и филтрирања секвенци, од чега прва два обухватају претходно спроведено разврставање и квалитативну обраду очитаних сирових секвенци (Слика 3). Наредни, односно трећи корак се одвија појединачно за сваки од анализираних узорака и чини груписање секвенци које потичу са истог локуса. Уколико је геномска библиотека секвенцирана у оба правца (*енгл. paired-end*), као што је случај у овом истраживању, тада се за спајање секвенци између којих постоји преклапање примењује алгоритам *VSEARCH* (Rognes и сар., 2016). Затим се, поновном применом *VSEARCH* алгоритма, секвенце пореклом са истог локуса групишу у кластере, да би се на крају приступило њиховом поравнању употребом алгоритма *MUSCLE* (Edgar, 2004). Поступак поравнања омогућава да у анализу буду уврштени и региони који садрже инделе. У четвртном кораку се процењује просечна хетерозиготност код сваке јединке, као и стопа грешке настале приликом секвенцирања. Код овог корака неопходно је одредити максималан број алела који појединачна јединка може садржати за сваки од анализираних региона. Како су у испитивни региони пореклом са диплоидног једарног или хаплоидног митохондријског генома, овај параметар је постављен на 2, те су из даље анализе уклоњени сви локуси који имају више од два алела унутар исте јединке. Током петог корака се за сваки узорак одређују консензус секвенце алела, при чему се одбацују кластери са дубином секвенционирања нижом од 5. На овај начин се поспешује раздвајање стварне хетерозиготности од варијабилности настале грешком у секвенцирању. Како би се додатно смањио удео грешке, подаци се филтрирају на основу највећег дозвољеног броја индела (8), као и максималне фракције хетерозиготних (0,05) и неодређених позиција (0,05) унутар кластера. Коначно се у шестом кораку анализирају сви узорци заједно, при чему долази до одређивања ортологних региона. Наиме, применом *VSEARCH* алгоритма се, претходно утврђене консензус секвенце, групишу према сличности између свих узорака. Након тогасе употребом алгоритма *MUSCLE* врши

поравнање унутар новоформираних кластера. Да би се две секвенце сматрале ортологним, те да би се груписале, неопходно је да удео сличности буде већи од граничне вредности (0,85) која је предложена од стране аутора софтвера. Завршни седми корак обухвата филтрирање и форматирање коначног поравнања ортологних региона, које се даље користи у истраживању молекуларног диверзитета. Најважнији параметар филтрирања у оквиру седмог корака јесте *min_sample_locus*, односно минималан број узорака код којих је одређени *ddRAD* локус присутан, да би тај локус био задржан у коначном сету података. Стога су у анализи генетичког диверзитета на нивоу *M. ruficornis* групе задржани само они локуси који се налазе у најмање 60% испитиваних јединки. Наиме, превисока вредност може довести до умањења броја анализираних података, с обзиром да се услед дивергенције ДНК, узорци могу разликовати у броју места сечења рестрикционих ензима, те се дозвољава одступање у разумном проценту. Са друге стране, прениска вредност може узроковати да се у анализу уведе секвенца присутна тек у неколико испитиваних узорака, чиме се повећава удео недостајућих података (*енгл. missing data*) у коначној матрици секвенци.



Слика 3. Шематски приказ биоинформатичке обраде *ddRAD-seq* података применом *ipyrad* програмског пакета.

4.2.4.4. Анализа филогенетских односа унутар *Merodon ruficornis* групе врста

Сагледавању филогенетских односа унутар *Merodon ruficornis* групе приступило се на основу стабала конструисаних применом метода највеће вероватноће (*енгл. Maximum Likelihood, ML*) и Бајесовог закључивања. Приликом конструкције коришћене су секвенце како појединачних, тако и комбинованих генетичких региона, са циљем уочавања потенцијалних разлика у филогенетским сигнаlima које настају као резултат различитости у еволуцији једарног и митохондријског генома. Додатно, како би се

проценио потенцијал филогенетског сигнала насталог деловањем инсерција и делеција, нуклеотидне празнине унутар *28S* гена и *ITS2* региона третиране су на два начина: 1) као непостојећи подаци или 2) као бинарни карактери на основу присуства/одсуства (1/0). Стога су за сваку анализу која је укључивала једарне регионе припремљене по две улазне матрице, једна базирана само на нуклеотидним секвенцама и друга, која поред нуклеотида садржи и бинарно очитане инделе. У анализу су укључене информације о подели матрица по партицијама на основу анализираних региона, као и бинарних података. Поред одабраног сета митохондријских и једарних региона, филогенетски односи су анализирани и на основу генерисаних *ddRAD-seq* локуса дистрибуираних на различитим местима у геному (детљи у поглављу 4.2.4.5). Врста *Merodon luteofasciatus* (Vujić и сар., 2018) коришћена је као аутгрупа код свих конструисаних стабла.

Филогенетска стабла највеће вероватноће (ML) конструисана су применом програмског пакета *RAxML 8.2.12* (Stamatakis, 2014) у оквиру *CIPRES Science Gateway* веб портала (Miller и сар., 2010). Анализа је рађена по *general time-reversible (GTR)* моделу еволуције са гама дистрибуцијом (Rodriguez и сар., 1990), следећи препоруку аутора програма, док је статистичка подршка клада процењена на основу *rapid bootstrap* методе са 1 000 понављања. Матрице бинарно очитаних индела садрже само варијабилне позиције, што може изазвати вештачко продужење грана, као и пристрасност у топологији стабала добијених анализом највеће вероватноће (Lewis, 2001; Tamuri и Goldman, 2017). До преувеличавања еволуционе дивергенције долази због тога што се одсуство неваријабилних позиција објашњава високим нивоом диверзитета, а не као намерна техника одабира података за анализу. Стога су секвенце са бинарним подацима кориговане по Луису, како би се избегла пристрасност у утврђивању (енгл. *Lewis ascertainment bias correction*).

Конструкција Бајесових филогенетских стабала је, на основу секвенци одабраног сета генетичких региона, изведена унутар програмског пакета *MrBayes 3.2.7a* (Ronquist и сар., 2012), посредством *CIPRES Science Gateway* веб портала, при чему је за сваки од испитиваних маркера коришћен одговарајући модел нуклеотидних супституција одређен у оквиру програмског пакета *MEGA X* (Kumar и сар., 2018). Анализа је рађена у два независна понављања за укупно четири Монте Карло Марковљева ланца (енгл. *Markov Chain Monte Carlo, MCMC*), од чега су два хладна и

два топла. Оба понављања су изведена у 10 000 000 итерација, уз записивање логаритамских вредности параметара модела на сваких 100 генерација. Применом програмског пакета *Tracer 1.7.1* (Rambaut и сар., 2018) је, на основу записаних логаритамских вредности, проверавано постизање конвергенције параметара анализе. Првих 25% итерација одбачено је као период загревања (енгл. *burn-in period*), док су резултати анализе приказани на основу *majority-rule* 50% косензус стабла. За визуелизацију добијених стабала коришћен је програмски пакет *FigTree 1.4.4* (Rambaut, 2018).

4.2.4.5. Конструисање стабла врста методом коалесценције

Најчешћи приступи процене стабла врста почивају на анализи матрице спојених секвенци које воде порекло из различитих геномских региона. Један од примера овакве методе јесте конструкција филогенетског стабла највеће вероватноће (*ML*). Међутим, присуство биолошких процеса, као што је непотпуно раздвајање линија (енгл. *Incomplete lineage sorting, ILS*), често се осликава на одређеном броју испитиваних региона, што потенцијално може утицати на механизам утврђивања стабла врста применом анализе комбинованих секвенци (Roch и Steel, 2015; Warnow, 2015). Како би се неутралисао утицај непотпуног раздвајања линија који се огледа у неподударности филогенетских сигнала одређених геномских региона са стварним односима између врста, развијене су сумарне методе коалесценције које прво процењују стабла појединачних гена, а затим их комбинују у стабло врста (Chou и сар., 2015). Ове методе претпостављају непостојање рекомбинација унутар испитиваних региона, како би се осигурало да сваки од региона има независну еволуциону историју и буде представљен појединачним генским стаблом (Springer и Gatesy, 2018). Међутим, овакви региони могу бити изузетно кратки и често су дуги испод 100 bp, што може узроковати велику грешку у процени стабла гена. Додатни недостатак се огледа у занемаривању варијабилности унутар генских стабала, што потенцијално може нарушити прецизност закључивања (Chou и сар., 2015). Стога, упркос теоријској предности сумарних метода, постоји отворена дебата о томе да ли *ML* анализа комбинованих секвенци пружа прецизну процену филогеније у биолошки реалистичним условима. Други начин конструкције коалесцентног стабла заснива се на принципима Бајесовог закључивања.

Међутим, овакав тип анализе може бити изузетно дуготрајан, посебно приликом испитивања великог сета геномских података.

Како би се превазишли недостаци сумарних метода, као и временска неефикасност Бајесовог закључивања, *Chifman и Kubatko* су 2014. године представили *SVDquartets* методу конструкције стабла врста засновану на коалесценцији. Ова метода заобилази процену стабла на основу сваког испитиваног локуса и анализу ради на основу вишелокусних и међусобно неповезаних података, односно полиморфизама појединачних нуклеотида (енгл. *Single nucleotide polymorphism, SNP*) из сваког региона. Утврђивање коалесцентног стабла врста започиње конструкцијом неукорењених квартерних стабала на основу свих могућих подскупова од два четири таксона. Како су унутар квартерних стабала могућа три различита начина раздвајања парова таксона на основу међусобне блискости, процена стварних односа врста заснива се на вредности параметра декомпозиције сингуларних вредности (енгл. *singular value decomposition, SVD*) који раздваја реалне поделе таксона од погрешних. Раздвајање резултата помоћу *SVD* параметра постаје израженије како се дужина грана у стаблу врста повећава и ефикасније је приликом анализе појединачних *SNP* података у односу на секвенце читавих региона. Стварна квартерна стабла се потом комбинују у коалесцентно стабло врста применом *Quartet MaxCut* алгоритма.

Како би се потврдили еволуциони односи и омогућио упоредни приказ различитих приступа, геномски подаци добијени *ddRAD* протоколом су поред *ML* анализе филогеније, испитивани и методом коалесценције са циљем утврђивања стабла врста. Према томе, стабло врста је процењено применом програмског пакета *Tetrad* 0.9.13, имплементираног унутар *ipyrad* алата за анализу (доступно на <https://ipyrad.readthedocs.io/en/latest/API-analysis/cookbook-tetrad.html>). *Tetrad* се, уз извесне измене, заснива на претходно описаној *SVDQuartets* методи. Наиме, основни *SVDQuartets* алгоритам претпоставља да су испитивани подаци међусобно неповезани, тако да филогенетске односе процењује на основу појединачне *SNP* позиције из сваког од анализираних региона што може резултовати потцењивањем присутног диверзитета. Насупрот томе, *Tetrad* ефикасно повећава опсег анализираних података, тако што за сваки сет од четири таксона независно узоркује по један *SNP* из сваког локуса, након чега се узорковање понавља са сваком *bootstrap* итерацијом. На овај начин се омогућава испитивање максималног броја међусобно неповезаних генетичких

података приликом утврђивања таксономских односа. Анализа коалесценције је рађена у 1 000 *bootstrap* понављања на основу свих могућих кварталних сетова. Стабло врста је укоренењено на *Merodon luteofasciatus* и визуелизовано у оквиру *FigTree* 1.4.4 програмског пакета (Rambaut, 2018).

4.2.4.6. Процена времена раздвајања између различитих линија у оквиру *Merodon ruficornis* групе

Време раздвајања клада унутар *M. ruficornis* групе процењено је на основу дивергенције секвенци *Cyt b* и *COI* генских региона, уз претпоставку мутационе стопе од 1,15% на милион година по линији, што представља стандардну стопу нуклеотидних промена у митохондријском геному артропода (Brower, 1994). Улазни Xml документи су припремљени у оквиру *BEAUti 1.8.1* софтвера, након чега је анализа изведена применом програмског пакета *BEAST 1.8.1* (Drummond и сар, 2012). Употребљен је *birth–death* модел настанка врста, док је као модел молекуларног сата узет *lognormal relaxed clock*, који претпоставља да свака линија може имати своју еволуциону стопу, која је независна од еволуције суседне гране. Анализа је изведена у 3 понављања са по 10 000 000 итерација, при чему су параметри модела записивани на сваких 100 генерација. Као супституциони модел коришћен је *Tamura-Nei, 93* модел еволуције са гама дистрибуцијом. Унутар програмског пакета *Tracer 1.7.1* (Rambaut и сар., 2018) проверавано је постизање конвергенције параметара анализе и првих 10% стабала одбачено је као период загревања. Стабла су сумирана у оквиру програмског пакета *TreeAnnotator 1.8.1*, применом *Maximum clade credibility tree* и *Mean heights* опција, док је за визуелни приказ коришћен *FigTree 1.4.4* програмски пакет (Rambaut, 2018).

4.2.4.7. Анализа секвенци 16S рРНК гена *Wolbachia* ендосимбионта

Прегледом хроматограмских записа у оквиру програмског пакета *BioEdit 7.2.5* (Hall, 1999), процењен је квалитет нуклеотидних секвенци 16S рРНК гена пореклом из генома *Wolbachia* ендосимбионта. Секвенце задовољавајућег квалитета су потом ручно поравнате и припадност *Wolbachia* роду је проверена поређењем са базом нуклеотидних секвенци (енгл. *Nucleotide collection database*) Америчког националног

центра за биотехнолошке информације (енгл. *National Center for Biotechnology Information, NCBI*), применом основног алата за претрагу локалних поравнања (енгл. *Basic Local Alignment Search Tool, BLAST*). Присутни хаплотипови су утврђени помоћу програмског пакета *DnaSP 6* (Rozas и сар., 2017).

4.2.5. Одређивање утицаја срединских фактора на обликовање генетичког диверзитета

Како би се испитала улога срединских фактора у обликовању генетичког диверзитета, подаци о 19 биоклиматских варијабли (Табела П2), као и надморској висини преузети су из глобалне базе климатских података (*WorldClim – Global Climate Data*). Коришћени су климатски подаци резолуције 2,5 arc минута, што је стандард за *IUCN* црвене листе (*International Union for the Conservation of Nature Red lists*), при чему су из свих анализа искључени подаци о изведеним климатским варијаблама, односно bio3 (изотермалност $(bio2/bio7) \times 100$) и bio7 (годишњи температурни опсег $(bio5-bio6)$). У табели П2 из прилога је пружен преглед анализираних биоклиматских варијабли, уз кратак опис сваке од њих.

4.2.5.1. Испитивање улоге срединских фактора у просторној дистрибуцији хаплотипова

Испитивање утицаја биоклиматских и геопросторних фактора на дистрибуцију, а сходно томе и на присуство дељених хаплотипова, спроведено је на основу анализе секвенци митохондријских маркера код врста *M. armipes*, *M. loewi* и *M. papillus*, за које је претходно откривено да деле заједничке варијанте мтДНК. Испитиване врсте су, услед међусобне генетичке блискости у мтДНК, посматране као једна целина, за коју су на основу хаплотипова појединачних анализираних маркера, припремљена четири различита сета података који се односе на: 1) *Cyt b* ген, 2) 5' фрагмент *COI* гена, 3) 3' фрагмент *COI* гена, као и на 4) целокупан *COI* ген код јединки са успешно амплификована оба фрагмента. Затим су на основу припремљених сетова израчунате фреквенције хаплотипова за сваки од локалитета, након чега су добијене вредности преведене у матрицу сличности која се заснива на *Bray – Curtis* дистанцама у фреквенцији хаплотипова између испитиваних локалитета. Вредности биоклиматских

и геопросторних варијабли су са друге стране нормализоване у циљу смањења распона вредности изражених у различитим мерним јединицама, а затим представљене у виду матрице засноване на Еуклидовим удаљеностима.

Како би се испитала улога срединских фактора у обликовању митохондријског диверзитета, приступљено је примени методе линеарног модела заснованог на дистанцама (енгл. *distance-based linear model, DistLM*) посредством пакета *PERMANOVA+* у оквиру програма *Primer 7* (Anderson и сар., 2008; Clarke и Gorley, 2015). Овај приступ представља пермутациони еквивалент анализи делимичне редувансе и има за циљ квантификацију удела варијације који је објашњен од стране једне и/или више предикторских варијабли, омогућавајући тиме дефинисање скупа срединских фактора који у највећој мери описује образац присутног генетичког диверзитета. Са тим у вези, маргинални тест у оквиру *DistLM* приступа омогућава процену повезаности варијансе генетичких података са сваким од анализираних (геопросторних и биоклиматских) фактора средине, чиме се пружа увид у њихов појединачан допринос. Сама метода полази од хипотезе да образац дистрибуције хаплотипова није у значајној мери објашњен варијацијама животне средине, при чему се статистичка значајност доприноса предикторских варијабли одређује на основу пермутационог теста, због чега овај модел не претпоставља нормалну дистрибуцију анализираних података. Стога, како би се одредио допринос појединачних срединских фактора и дефинисале геопросторне и биоклиматске варијабле које имају значајну улогу у обликовању генетичког диверзитета мтДНК, примењен је маргинални тест. Статистичка значајност сваког од испитиваних предиктора је одређена на основу пермутационог теста са 1 000 понављања.

Следећи корак је подразумевао примену секвенцијалног теста, који има за циљ проналажење комбинације срединских варијабли које заједно објашњавају највећи удео варијансе у просторној дистрибуцији хаплотипова испитиваних митохондријских маркера. Анализа је спроведена применом *step-wise* селекције, при чему је критеријум одабира регресионог модела заснован на вредности Аикаке информационог критеријума коригованог за малу величину узорка (AICc). Како секвенцијални тест претпоставља независност између испитиваних предиктора, мултиколинеарност срединских варијабли је смањена на основу фактора варијансе инфлације (енгл. *variance inflation factor, VIF*) који је израчунат за сваки сет података. Вредност изнад 10

указује на постојање мултиколинеарности, тако да су анализе обухватиле само оне варијабле код којих *VIF* не превазилази наведени праг. Према томе, у анализи су коришћене следеће геопросторне и биоклиматске карактеристике: географска ширина (*lat. latitudo, LAT*), географска дужина (*lat. longitudo, LON*) и надморска висина, затим bio2, bio4, bio5, bio6, bio8, bio9, bio12, bio14 и bio16 (Табела П2).

4.2.5.2. Испитивање утицаја срединских фактора на генетичку варијабилност унутар врста

Улога коју биоклиматски и геопросторни фактори имају у обликовању обрасца генетичког диверзитета унутар врста из *M. ruficornis* групе, процењена је код четири врсте са ширим географским распрострањењем — *M. armipes*, *M. loewi*, *M. auripes* и *M. trebevicensis*, унутар којих је показано присуство популационе диференцијације. Са тим у вези, како би се идентификовали најважнији еколошки покретачи диверзификације унутар испитиваних врста, примењен је *Gradient forest (GF)* приступ надгледаног машинског учења заснованог на *Random forest (RF)* моделу, који при тренирању класификације над скупом података генерише колекцију регресионих стабала одлука (Ellis и сар., 2012). Наиме, *GF* класификација омогућава утврђивање значајности појединачних срединских фактора у предикцији учесталости алела, као и идентификацију граничних вредности предикторских варијабли у којима се дешавају најважније композиционе промене у исходима класификације. На основу добијених регресионих стабала се за сваки од испитиваних предиктора дефинише нелинеарна монотона функција, која приказује промене у фреквенцији алела дуж градијента вредности испитиваних предиктора, чиме се омогућава процена важности појединачних карактеристика средине у обликовању обрасца генетичког диверзитета. Ова процена важности дефинише се на основу метрика прецизности (*енгл. Accuracy*) и грешке (R^2) које описују битност и поузданост предикција појединачних самосталних срединских варијабли у односу на предикцију целокупног *GF* модела.

Како би се проценио утицај срединских варијабли на дистрибуцију генетичке варијабилности, за сваку од испитиваних врста припремљен је посебан сет података. Наиме, према захтевима самог алгорита, биалелни и моноалелни *SNP* подаци добијени *ddRAD-seq* приступом су помоћу *VCFtools* програмског пакета (Danesek и

сар., 2011) преведени у генотипове, тако да су индивидуе за сваки локус *SNP* представљене у виду хомозигота или хетерозигота. С обзиром да *GF* не претпоставља независност између генетичких података, у анализу су укључени сви биалелни *SNP* подаци, независно од тога да ли потичу са истих или различитих *ddRAD* локуса (Fitzpatrick и Keller, 2015). Поред тога, подаци су додатно филтрирани, при чему су из даље анализе искључени *SNP* подаци који су присутни код мање од 80% испитиваних јединки, као и они чија је фреквенција алела унутар врсте мања од 0,01, чиме је смањена могућност настанка лажно позитивних резултата. *Gradient forest* анализа је спроведена унутар *R* програмског окружења применом пакета *gradientForest* (Ellis и сар., 2012), при чему је модел процењен на основу 1 000 стабала регресије, уз променљиви праг корелације од 0,5.

5. Резултати

Геномска ДНК је изолована за укупно 241 адултну јединку осоликих мува из *Merodon ruficornis* групе врста. Број испитиваних узорака по врсти се разликовао у зависности од дистрибуције саме врсте, а зависио је и од поклапања периода узорковања са активношћу врсте, као и потешкоћа у прикупљању материјала на појединим локалитетима. Молекуларни диверзитет је код прикупљених узорака процењен на основу варијабилности 5 одабраних генетичких региона, односно 3 молекуларна маркера митохондријског генома, као и 2 молекуларна маркера смештена у једарном геному. Ланчана реакција полимеразе је код свих испитиваних јединки амплификовала 5' крај *COI* гена, док је успешност реакције за 3' крај истог гена била нешто нижа, тако да и поред додатне оптимизације и понављања *PCR* реакције, коначан производ 3' *COI* региона је добијен у 99,17% случајева. Максимална ефикасност умножавања је електрофоретским путем забележена и код *Cyt b* гена, док је код једарних маркера реакција била успешна у 98,75% случајева за *D2-3* регион *28S* рРНК гена, односно у 96,68% случајева за *ITS2* генетички регион. Међутим, само нуклеотидне секвенце задовољавајућег квалитета су уврштене у матрице и као такве коришћене у даљим анализама. Према томе, молекуларни диверзитет је код свих узорака сагледан применом 5' региона *COI* гена, док је варијабилност 3' *COI* региона испитивана код 231 јединке, *Cyt b* гена код 240 јединки, *D2-3* региона *28S* рРНК гена код 235 јединки и *ITS2* генетичког региона код 216 јединки.

Са циљем додатног расветљавања таксономских односа унутар *M. ruficornis* групе, сет одабраних узорака је подвргнут *ddRAD-seq* генотипизацији, на основу које је омогућено испитивање хиљаде маркера дистрибуираних широм генома. Број прочитаних секвенци по узорку (*енгл. reads*) се кретао у опсегу од 47 174 до 39 348 439, при чему је током биоинформатичке обраде из даље анализе искључено 4 јединке за које је продуковано мање од 500 000 сирових секвенци, тако да је коначан сет бројао 87 узорака из *M. ruficornis* групе врста (Табела П3). Након завршне фазе филтрирања, дефинисани сет података за испитивање генетичког диверзитета *M. ruficornis* групе био је заснован на матрици секвенци укупне дужине 763 988 bp, која је обухватала 2912 различитих *ddRAD* локуса, уз удео од 18,48% недостајућих података (*енгл. missing data*). Генерисани сет података је бројао укупно 97 509 полиморфизама појединачних нуклеотида (*SNP*), код којих је забележен недостатак података у износу од 16.71%

5.1. Молекуларни диверзитет одабраних митохондријских и једарних генетичких региона

5.1.1. Варијабилност секвенце митохондријског *COI* гена

У циљу испитивања молекуларног диверзитета, секвенце оба краја *COI* гена су комбиноване у заједничку матрицу укупне дужине 1377 bp, од чега је 5' регион чинио 613 bp, док је дужина 3' *COI* региона обухватала преосталих 764 bp. Анализа комбиноване матрице спроведена је само код јединки за које су успешно генерисане секвенце оба краја *COI* гена, односно код 231 јединке, што је 95,9% од укупног узорка. Унутар испитиваног сета откривено је 225 варијабилних позиција (Табела 2) на основу којих је дефинисано 95 хаплотипова (Табела 3), од којих је за хаплотип 44 забележено да се јавља код две морфолошки јасно дефинисане врсте, односно *M. armipes* и *M. loewi* са Балкана.

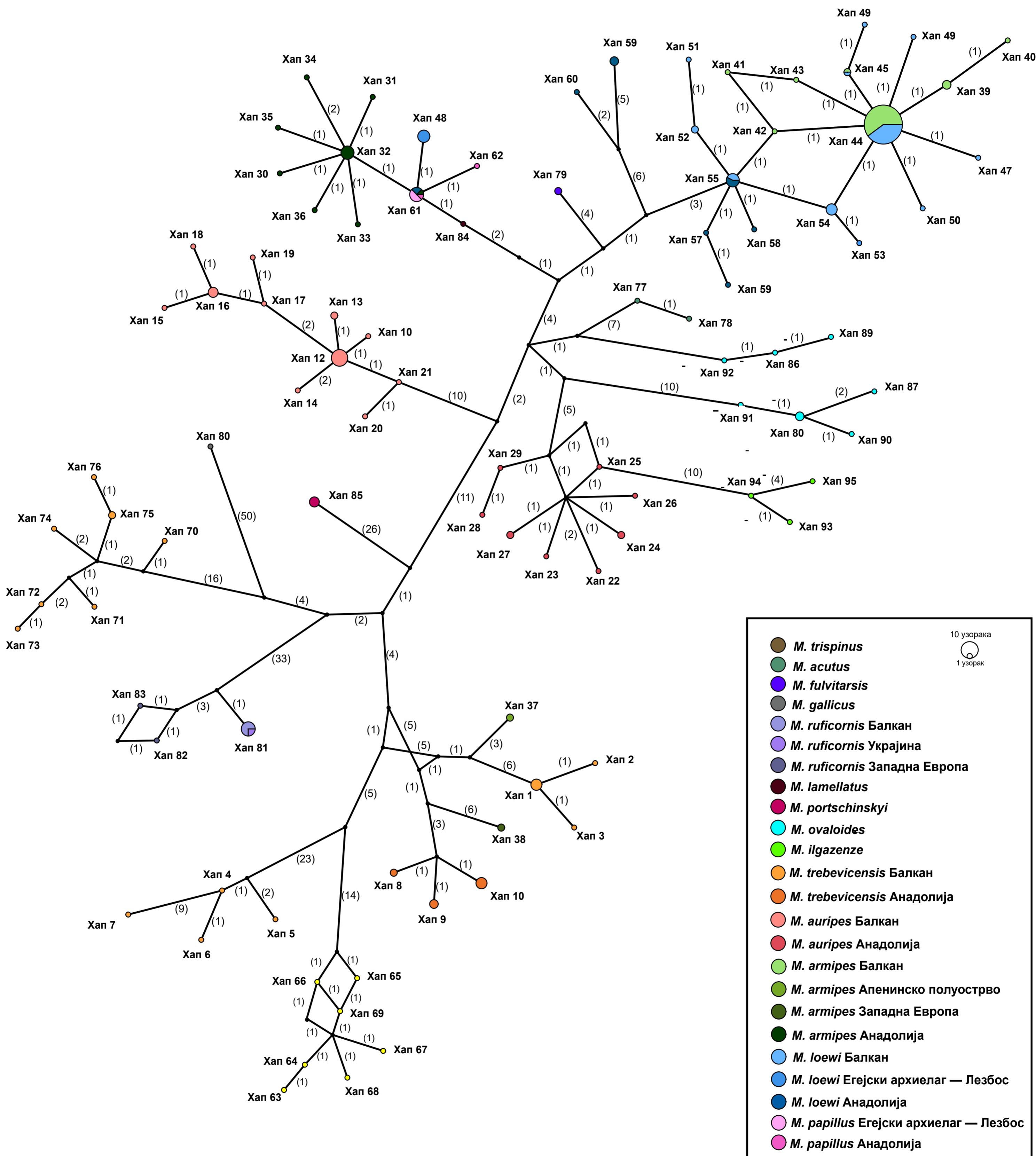
Табела 2. Основни параметри генетичког диверзитета *Merodon ruficornis* групе врста засновани на секвенцама комбинованих 3' и 5' региона митохондријског *COI* гена.

	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>h</i>	<i>Hd</i>	<i>K</i>	π
1. <i>M. trebevicensis</i>	22	58	10	0,874	17,88	0,01323
2. <i>M. auripes</i>	35	35	19	0,892	9,563	0,00699
3. <i>M. hoplitis</i>	7	7	7	1	2,476	0,00181
4. <i>M. trispinus</i>	8	12	7	0,964	3,929	0,00288
5. <i>M. acutus</i>	2	1	2	1	1	0,00073
6. <i>M. papillus</i>	6	1	2	0,333	0,333	0,00024
7. <i>M. armipes</i>	61	48	15	0,641	7,179	0,00525
8. <i>M. loewi</i>	60	32	18	0,815	5,325	0,00391
9. <i>M. fulvitarsis</i>	2	0	1	0	0	0
10. <i>M. ovaloides</i>	9	23	7	0,917	10,333	0,00755
11. <i>M. ilgazenze</i>	3	5	3	1	3,333	0,00244
12. <i>M. ruficornis</i>	10	6	3	0,378	1,822	0,00133
13. <i>M. portschinskyi</i>	4	0	1	0	0	0
14. <i>M. gallicus</i>	1	0	1	0	0	0
15. <i>M. lamellatus</i>	1	0	1	0	0	0
<i>M. ruficornis</i> група	231	225	95	0,924	25,643	0,01923

N - број секвенци ; *S* - број полиморфних позиција; *h* - број хаплотипова; *Hd* - диверзитет хаплотипова; *K* - просечан број нуклеотидних разлика; π - диверзитет нуклеотида.

Присуство заједничког хаплотипа између различитих врста уочено је и код *M. armipes* и *M. loewi* са Анадолијског полуострва, за које је утврђено да идентичну *COI*

секвенцу деле, како међусобно, тако и са јединкама врсте *M. papillus* сакупљеним на Лезбосу и Анатолијском полуострву. За све остале хаплотипове је показана специфична припадност појединачној врсти. Поред тога је на основу хаплотипова уочена различитост између популација са Балканског и Анадолијског полуострва унутар врста *M. armipes*, *M. trebevicensis* и *M. auripes*, као и присуство јединствених хаплотипова код јединки *M. armipes* пореклом из Западне Европе (Француска) и са Апенинског полуострва (Слика 4). Разлика у секвенци *COI* гена откривена је и код *M. ruficornis* пореклом из Западне Европе у односу на јединке са Балкана и из Украјине. На основу оба краја *COI* гена је за *M. ruficornis* групу израчунат диверзитет хаплотипова (Hd) у вредности од 0,924, просечан број нуклеотидних разлика (K) од 25,643, као и диверзитет нуклеотида (π) који износи 0,01923 (Табела 2).



Слика 4. Median-joining мрежа COI хаплотипова *Merodon ruficornis* групе врста дефинисаних на основу секвенци комбинованих фрагмената 3' и 5' COI гена.

Табела 3. Преглед хаплотипова *Merodon ruficornis* групе врста дефинисаних на основу секвенци комбинованих фрагмената 3' и 5' *COI* гена.

<i>Xan1</i>	RU41, RU42, RUT1, RUT2, RUT3, RUT5	<i>M. trebevicensis</i> Србија (Дубашница)	<i>M. trebevicensis</i> Балкан	<i>Xan48</i>	RU259, RU411, RU410, RU412, RU415, RU416	<i>M. loewi</i> Грчка (Лезбос)	<i>M. loewi</i> Егејски архипелаг — Лезбос		
<i>Xan2</i>	RU43			<i>Xan49</i>	RU116	<i>M. loewi</i> Р. С. Македонија (Кожуф)			
<i>Xan3</i>	RUT4			<i>Xan50</i>	RU120	<i>M. loewi</i> Србија (Ђерлап, Сува планина)			
<i>Xan4</i>	RU254			<i>Xan51</i>	RU126				
<i>Xan5</i>	RU255			<i>Xan52</i>	RU128, RU129				
<i>Xan6</i>	FIN27			<i>Xan53</i>	RU130				
<i>Xan7</i>	RU44			<i>M. trebevicensis</i> Црна Гора (Проклетије)	<i>Xan54</i>	RU135, RU136, RU137, RU138, RU144	<i>M. loewi</i> Балкан		
<i>Xan8</i>	RU45, RU49	<i>M. trebevicensis</i> Грчка (Олимп)	<i>Xan55</i>	AU957, RU263, RU264, RU265, RU127, RU142, RU145					
<i>Xan9</i>	RU46, RU47, RU51	<i>M. trebevicensis</i> Турска (Рахат)	<i>M. trebevicensis</i> Анадолија	<i>Xan56</i>	AU954	<i>M. loewi</i> Турска (Испарта)	<i>M. loewi</i> Анадолија — Црноморска регија		
<i>Xan10</i>	RU48, RU50, RU52, RU53, RU54	<i>M. auripes</i> Грчка (Драма), Србија (Ђерлап, Мироч) и Црна Гора (Маглић, Ловћен)	<i>M. auripes</i> Балкан	<i>Xan57</i>	AU955	<i>M. loewi</i> Анадолија (Фетије)			
<i>Xan11</i>	RU58			<i>Xan58</i>	AU956				
<i>Xan12</i>	RU56, RU57, RU59, RU280, RU283, RU284, RU279, RU286, AU1828, RU421, RU422			<i>Xan59</i>	RU178, RU179, RU180				
<i>Xan13</i>	RU287, RU290			<i>M. auripes</i> Црна Гора (Ловћен)	<i>Xan60</i>	RU181	<i>M. loewi</i> Анадолија (Фетије)		<i>M. loewi</i> Анадолија — Егејска регија
<i>Xan14</i>	RU55			<i>M. auripes</i> Црна Гора (Дурмитор)	<i>Xan61</i>	RU182, RU183, RU184, AU960, RU439, RU441, RU434, RU398	<i>M. loewi</i> Анадолија (Илгаз)	<i>M. loewi</i> Анадолија — Црноморска регија	
<i>Xan15</i>	RU65			<i>M. auripes</i> Грчка (Маинало)			<i>M. armipes</i> Анадолија (Илгаз)	<i>M. armipes</i> Анадолија — Црноморска регија	
<i>Xan16</i>	RU66, RU60, RU61, RU62						<i>M. papillus</i> Грчка (Лезбос)	<i>M. papillus</i> Егејски архипелаг — Лезбос	
<i>Xan17</i>	RU63						<i>M. papillus</i> Анадолија (Испарта)		<i>M. papillus</i> Анадолија
<i>Xan18</i>	RU64						<i>M. hoplitis</i> Црна Гора (Ловћен и Орјен)		<i>M. hoplitis</i>
<i>Xan19</i>	RU68								
<i>Xan20</i>	RU67								
<i>Xan21</i>	RU69	<i>M. auripes</i> Грчка (Пиндос)	<i>M. auripes</i> Анадолија	<i>Xan63</i>	RU186	<i>M. trispinus</i> Турска (Бабадаг, Бонцук Даглари, Фетије, Измир)		<i>M. trispinus</i>	
<i>Xan22</i>	RU76								
<i>Xan23</i>	RU77								
<i>Xan24</i>	RU73, RU74								
<i>Xan25</i>	RU78								
<i>Xan26</i>	RU72								
<i>Xan27</i>	RU447, RU452								
<i>Xan28</i>	RU70								
<i>Xan29</i>	RU71	<i>M. auripes</i> Турска (Баликесир)	<i>Xan71</i>	RU192	<i>M. acutus</i> Русија (Кавказ)		<i>M. acutus</i>		
<i>Xan30</i>	RU448	<i>M. armipes</i> Турска (Болу)	<i>M. armipes</i> Анадолија	<i>Xan72</i>				RU193	
<i>Xan31</i>	RU449		<i>Xan73</i>	RU194					
<i>Xan32</i>	RU450, RU466, RU465, RU468, RU469, RU471, RU473		<i>Xan74</i>	RU196					
<i>Xan33</i>	RU451		<i>Xan75</i>	RU197, RU198					
<i>Xan34</i>	RU453		<i>Xan76</i>	RU199					
<i>Xan35</i>	RU467		<i>Xan77</i>	RU201	<i>M. fulvitaris</i> Иран		<i>M. fulvitaris</i>		
<i>Xan36</i>	RU472	<i>M. armipes</i> Италија (Трентино)	<i>M. armipes</i> Апенинско полуострво	<i>Xan78</i>	RU202	<i>M. gallicus</i> Француска (Тенде)		<i>M. gallicus</i>	
<i>Xan37</i>	RU86, RU87	<i>M. armipes</i> Француска (Монклар)	<i>M. armipes</i> Западна Европа	<i>Xan79</i>	RU189, RU190	<i>M. ruficornis</i> Србија (Власина, Копаноник, Фрушка гора) и Црна Гора (Дурмитор)		<i>M. ruficornis</i> Балкан	
<i>Xan38</i>	AU1823, AU1824	<i>M. armipes</i> Црна Гора (Дурмитор)	<i>M. armipes</i> Балкан	<i>Xan80</i>	AU1820	<i>M. ruficornis</i> Украјина (Иваново-Франковска област)		<i>M. ruficornis</i> Украјина	
<i>Xan39</i>	RU80, RU81, RU82	<i>M. armipes</i> Србија (Ђерлап)		<i>Xan81</i>	RU276, AU1837, AU1836, AU1833, AU1834, RU210, RU424, RU425	<i>M. ruficornis</i> Француска (Тенде)		<i>M. ruficornis</i> Западна Европа	
<i>Xan40</i>	RU83			<i>Xan82</i>	AU1821	<i>M. lamellatus</i> Турска (Гуџуку)		<i>M. lamellatus</i>	
<i>Xan41</i>	RU101			<i>Xan83</i>	AU1822	<i>M. portschinskyi</i> Грузија (Имеретија)		<i>M. portschinskyi</i>	
<i>Xan42</i>	RU102			<i>M. armipes</i> Црна Гора (Дурмитор, Проклетије, Ловћен, Орјен, Румија), Србија (Стара планина, Вршачке планине, Фрушка гора, Копаноник, Ђерлап, Голија, Камена Гора, Златибор), Грчка (Драма), Хрватска (Истра, Црес, Крк) и Словенија (Шмарје)	<i>Xan84</i>	RU203	<i>M. ovaloides</i> Турска (Илгаз)		<i>M. ovaloides</i>
<i>Xan43</i>	RU106	<i>Xan85</i>			AU1831, RU312, RU314, AU1830				
<i>Xan44</i>	RU85, RU175, RU164, RU165, RU167, RU168, RU172, RU173, RU174, RU171, RU176, RU188, RU88, RU89, RU90, RU92, RU93, RU237, RU94, RU96, RU103, RU104, RU105, RU107, RU109, RU111, RU113, RU114, RU115, RU170, RU112, RU117, RU118, RU119, RU143, RU149, RU150, RU151, RU152, RU153, RU154, RU155, RU159, RU160, RU219, RU217, RU218, RU220, RU221, RU223, RU224, RU225, RU292, RU235, RU236, RU238, RU241, RU243, AU1844, RU298	<i>M. loewi</i> Грчка (Пиндос, Еримантос, Аркадија, Маиноло), Р. С. Македонија (Кожуф), Србија (Ђерлап)			<i>Xan86</i>	RU432			
					<i>Xan87</i>	RU433			
					<i>Xan88</i>	RU435, RU436, RU446			
					<i>Xan89</i>	RU440			
<i>Xan90</i>	RU442	<i>M. ilgazenze</i> Турска (Илгаз)	<i>M. ilgazenze</i>		<i>Xan91</i>	RU443			
<i>Xan92</i>	RU445								
<i>Xan93</i>	RU437								
<i>Xan94</i>	RU438								
<i>Xan95</i>	RU444								
<i>Xan45</i>	RU161	<i>M. loewi</i> Грчка (Еримантос)	<i>M. loewi</i> Балкан						
<i>Xan46</i>	RU169	<i>M. loewi</i> Грчка (Пиндос)							
<i>Xan47</i>	RU177								

Анализом секвенци 5' региона *COI* гена је на основу 101 варијабилне позиције дефинисано укупно 58 хаплотипова, од којих је већина јединствена за врсту (Табела 4). Међутим, као и код комбинованог *COI* сета, између врста *M. armipes* и *M. loewi* откривено је присуство дељених хаплотипова, док је за *M. papillus* уочено да дели заједничку ДНК баркод секвенцу са јединкама *M. armipes* из Турске, као и са узорцима врсте *M. loewi* пореклом са Лезбоса и Анадолијског полуострва. Унутар врста *M. armipes*, *M. trebevicensis* и *M. auripes* није откривено присуство дељених 5' *COI* хаплотипа између популација са Балканског и Анадолијског полуострва. Поред тога, јединствени хаплотипови су забележени и за *M. armipes* пореклом из Западне и Централне Европе, као и са Апенинског полуострва. Са друге стране, испитивањем варијабилности 3' региона *COI* гена је уочено присуство 126 полиморфних позиција и 74 хаплотипа, од којих је хаплотип 34 заједнички за *M. armipes* и *M. loewi* са Балкана, док је секвенца хаплотипа 48 присутна код четири врсте, односно *M. papillus*, *M. lamellatus*, као и узорака врста *M. armipes* и *M. loewi* пореклом са Анадолијског полуострва (Табела 5). Анализом 5' *COI* региона је утврђен диверзитет хаплотипова (Hd) који износи 0,841, просечан број нуклеотидних разлика (K) од 10,945, као и диверзитет нуклеотида (π) у вредности од 0,01829 (Табела 6); док је 3' крај *COI* гена показао виши ниво варијабилности са диверзитетом хаплотипова (Hd) у износу од 0,921, просечним бројем нуклеотидних разлика (K) од 14,77 и диверзитетом нуклеотида (π) који износи 0,02009 (Табела 7).

Табела 4. Преглед хаплотипова *Merodon ruficornis* групе врста дефинисаних на основу секвенци 5' фрагмента *COI* гена.

<i>Xan1</i>	RU41, RU42, RU43, RUT1, RUT2, RUT3, RUT5	<i>M. trebevicensis</i> Србија (Дубашница)	
<i>Xan2</i>	RU4		
<i>Xan3</i>	RU254	<i>M. trebevicensis</i> Србија (Голија) и Грчка (Фалакро)	<i>M. trebevicensis</i> Балкан
<i>Xan4</i>	RU255		
<i>Xan5</i>	RU274		
<i>Xan6</i>	FIN27	<i>M. trebevicensis</i> Црна Гора (Проклетије)	
<i>Xan7</i>	RU44	<i>M. trebevicensis</i> Грчка (Олимп)	
<i>Xan8</i>	RU318	<i>M. trebevicensis</i> Украјина (Крим)	<i>M. trebevicensis</i> Украјина
<i>Xan9</i>	RU45, RU49, RU46, RU47, RU51, RU48, RU50, RU52, RU53, RU54	<i>M. trebevicensis</i> Турска (Рахат)	<i>M. trebevicensis</i> Анатолија: Рахат
<i>Xan10</i>	RU55	<i>M. auripes</i> Црна Гора (Дурмитор)	
<i>Xan11</i>	RU65	<i>M. auripes</i> Грчка (Маинало)	<i>M. auripes</i> Балкан
<i>Xan12</i>	RU68		
<i>Xan12</i>	RU58		
<i>Xan13</i>	RU56, RU57, RU59, RU66, RU60, RU61, RU62, RU63, RU64, RU321, RU322, RU67, RU69, RU280, RU283, RU284, RU279, RU286, RU287, RU290, AU1828, RU421, RU422	<i>M. auripes</i> Грчка (Драма, Маинало Пиндос), Србија (Ђердап, Мироч), Црна Гора (Маглић, Ловћен)	
<i>Xan14</i>	RU422	<i>M. auripes</i> Украјина (Одешка област)	<i>M. auripes</i> Украјина — Одешка област
<i>Xan15</i>	RU323, RU324	<i>M. auripes</i> Украјина (Запорошка област)	<i>M. auripes</i> Украјина — Запорошка област
<i>Xan16</i>	RU76	<i>M. auripes</i> Турска (Боздаг, Бољу)	<i>M. auripes</i> Анатолија
<i>Xan17</i>	RU77		
<i>Xan18</i>	RU73, RU74		
<i>Xan19</i>	RU78, RU72, RU447, RU452		
<i>Xan20</i>	RU70, RU71	<i>M. auripes</i> Турска (Баликесир)	
<i>Xan21</i>	RU451	<i>M. armipes</i> Турска (Бољу)	<i>M. armipes</i> Анатолија
<i>Xan22</i>	RU453		
<i>Xan23</i>	RU467		
<i>Xan24</i>	RU182, RU183, RU184, RAU959, AU960, RU259, RU439, RU441, RU448, RU434, RU449, RU450, RU466, RU465, RU468, RU469, RU471, RU472, RU473, RU398, RU411, RU410, RU412, RU415, RU416	<i>M. armipes</i> Турска (Илгаз)	
		<i>M. papillus</i> Грчка (Лезбос)	<i>M. papillus</i> Егејски архипелаг — Лезбос
		<i>M. papillus</i> Турска (Испарта)	<i>M. papillus</i> Анатолија
		<i>M. loewi</i> Грчка (Лезбос)	<i>M. loewi</i> Егејски архипелаг — Лезбос
		<i>M. loewi</i> Турска (Илгаз)	<i>M. loewi</i> Анатолија — Црноморска регија
<i>Xan25</i>	RU325, AU955	<i>M. loewi</i> Турска (Испарта)	<i>M. loewi</i> Анатолија — Средоземна регија
<i>Xan26</i>	RU86, RU87	<i>M. armipes</i> Украјина (Одешка област)	<i>M. armipes</i> Украјина
<i>Xan27</i>	AU1823, AU1824, RU79	<i>M. armipes</i> Италија (Трентино)	<i>M. armipes</i> Апенинско полуострво
<i>Xan28</i>	RU80, RU81, RU82, RU83, RU326, RU85, RU175, AU957, RU263, RU264, RU265, RU164, RU165, RU167, RU168, RU169, RU172, RU173, RU174, RU171, RU176, RU177, RU188, RU88, RU89, RU90, RU92, RU93, RU94, RU237, RU96, RU101, RU102, RU103, RU104, RU105, RU106, RU107, RU109, RU111, RU113, RU114, RU115, RU170, RU112, RU116, RU117, RU118, RU119, RU120, RU126, RU127, RU128, RU129, RU130, RU135, RU136, RU137, RU138, RU142, RU143, RU144, RU145, RU149, RU150, RU151, RU152, RU153, RU154, RU155, RU159, RU160, RU161, RU219, RU217, RU218, RU220, RU221, RU223, RU224, RU225, RU292, RU235, RU236, RU238, RU241, RU243, AU1844, RU298	<i>M. armipes</i> Црна Гора (Дурмитор, Проклетије, Ловћен, Орјен, Румија), Србија (Стара планина, Вршачке планине, Фрушка гора, Копоник, Ђердап, Голија, Камена Гора, Златибор), Грчка (Драма), Хрватска (Истра, Црес, Крк) и Словенија (Шмарје)	<i>M. armipes</i> Балкан
		<i>M. armipes</i> Украјина (Одешка област)	<i>M. armipes</i> Украјина
		<i>M. loewi</i> Грчка (Пиндос, Еримантос, Маиноло, Аркадија), Р. С. Македонија (Кожуф) и Србија (Ђердап, Сува планина)	<i>M. loewi</i> Балкан
		<i>M. loewi</i> Турска (Испарта)	<i>M. loewi</i> Анатолија — Средоземна регија
		<i>M. loewi</i> Турска (Испарта)	<i>M. loewi</i> Анатолија — Средоземна регија
<i>Xan29</i>	AU954		
<i>Xan30</i>	AU956		
<i>Xan31</i>	RU178, RU179, RU180	<i>M. loewi</i> Турска (Фетије)	<i>M. loewi</i> Анатолија — Егејска регија
<i>Xan32</i>	RU181		
<i>Xan33</i>	RU328	<i>M. loewi</i> Украјина (Одешка област)	<i>M. loewi</i> Украјина
<i>Xan34</i>	RU186	<i>M. hoplitis</i> Црна Гора (Орјен, Ловћен)	<i>M. hoplitis</i>
<i>Xan35</i>	AU1847		
<i>Xan36</i>	AU1846		
<i>Xan37</i>	AU1848, RU187, RU351		
<i>Xan38</i>	RU185		
<i>Xan39</i>	RU191	<i>M. trispinus</i> Турска (Бабадаг, Бонцук Даглари, Фетије, Измир)	<i>M. trispinus</i>
<i>Xan40</i>	RU192, RU197, RU198		
<i>Xan41</i>	RU193		
<i>Xan42</i>	RU194		
<i>Xan43</i>	RU196		
<i>Xan44</i>	RU199		
<i>Xan45</i>	RU201	<i>M. acutus</i> Русија (Кавказ)	<i>M. acutus</i>
<i>Xan46</i>	RU202		
<i>Xan47</i>	RU189, RU190	<i>M. fulvitaris</i> Иран	<i>M. fulvitaris</i>
<i>Xan48</i>	AU1820	<i>M. gallicus</i> Француска (Тенде)	<i>M. gallicus</i>
<i>Xan49</i>	RU276, AU1837, AU1836, AU1833, AU1834, RU210, RU424, RU425	<i>M. ruficornis</i> Србија (Власина, Копоник, Фрушка гора), Црна Гора (Дурмитор)	<i>M. ruficornis</i> Балкан
		<i>M. ruficornis</i> Украјина (Иваново-Франковска област)	<i>M. ruficornis</i> Украјина
<i>Xan50</i>	AU1821, AU1822	<i>M. ruficornis</i> Француска (Тенде)	<i>M. ruficornis</i> Западна Европа
<i>Xan51</i>	RU203	<i>M. lamellatus</i> Турска (Гуцуку)	<i>M. lamellatus</i>
<i>Xan52</i>	AU1831, RU312, RU314, AU1830	<i>M. portschinskyi</i> Грузија (Имеретија)	<i>M. portschinskyi</i>
<i>Xan53</i>	RU432, RU440	<i>M. ovaloides</i> Турска (Илгаз)	<i>M. ovaloides</i>
<i>Xan54</i>	RU433		
<i>Xan55</i>	RU435, RU436, RU442, RU443, RU446		
<i>Xan56</i>	RU445		
<i>Xan57</i>	RU437, RU438	<i>M. ilgazense</i> Турска (Илгаз)	<i>M. ilgazense</i>
<i>Xan58</i>	RU444		

Табела 5. Преглед хаплотипова *Merodon ruficornis* групе врста дефинисаних на основу секвенци 3'фрагмента *COI* гена.

<i>Xan1</i>	RU41, RU42, RUT1, RUT2, RUT03, RUT5, RUT3	<i>M. trebevicensis</i> Балкан (Дубашница)	
<i>Xan2</i>	RU43		<i>M. trebevicensis</i> Балкан
<i>Xan3</i>	RU255		
<i>Xan4</i>	RU254, FIN27	<i>M. trebevicensis</i> Црна Гора (Проклетије) и Србија (Голија)	
<i>Xan5</i>	RU44	<i>M. trebevicensis</i> Грчка (Олимп)	
<i>Xan6</i>	RU45, RU49		
<i>Xan7</i>	RU46, RU47, RU51	<i>M. trebevicensis</i> Турска (Рахат)	<i>M. trebevicensis</i> Анатолија: Рахат
<i>Xan8</i>	RU48, RU50, RU52, RU53, RU54		
<i>Xan9</i>	RU58, RU56, RU57, RU59, RU55, RU280, RU283, RU284, RU279, RU286, AU1828, RU421, RU422	<i>M. auripes</i> Грчка (Драма), Србија (Ђердап, Мироч), Црна Гора (Маглић, Ловћен, Дурмитор)	
<i>Xan10</i>	RU287, RU290	<i>M. auripes</i> Црна Гора (Ловћен)	
<i>Xan11</i>	RU65, RU66, RU60, RU61, RU62		<i>M. auripes</i> Балкан
<i>Xan12</i>	RU63	<i>M. auripes</i> Грчка (Маинало)	
<i>Xan13</i>	RU64		
<i>Xan14</i>	RU67		
<i>Xan15</i>	RU69	<i>M. auripes</i> Грчка (Пиндос)	
<i>Xan16</i>	RU76		
<i>Xan17</i>	RU77, RU73, RU74		
<i>Xan18</i>	RU78	<i>M. auripes</i> Турска (Боздаг)	
<i>Xan19</i>	RU72		<i>M. auripes</i> Анатолија
<i>Xan20</i>	RU447, RU452	<i>M. auripes</i> Турска (Бољу)	
<i>Xan21</i>	RU70		
<i>Xan22</i>	RU71	<i>M. auripes</i> Турска (Баликесир)	
<i>Xan23</i>	RU448		
<i>Xan24</i>	RU449		
<i>Xan25</i>	RU450, RU451, RU453, RU466, RU465, RU467, RU468, RU469, RU471, RU473	<i>M. armipes</i> Турска (Бољу)	<i>M. armipes</i> Анатолија
<i>Xan26</i>	RU472		
<i>Xan27</i>	RU86, RU87	<i>M. armipes</i> Италија (Трентино)	<i>M. armipes</i> Апенинско полуострво
<i>Xan28</i>	AU1823, AU1824	<i>M. armipes</i> Француска (Монклар)	<i>M. armipes</i> Западна Европа
<i>Xan29</i>	RU80, RU81, RU82		
<i>Xan30</i>	RU83	<i>M. armipes</i> Црна Гора (Дурмитор)	
<i>Xan31</i>	RU101		
<i>Xan32</i>	RU102		
<i>Xan33</i>	RU106	<i>M. armipes</i> Србија (Ђердап)	
			<i>M. armipes</i> Балкан
<i>Xan34</i>	RU85, RU175, RU164, RU165, RU167, RU168, RU172, RU173, RU174, RU171, RU176, RU188, RU88, RU89, RU90, RU92, RU93, RU237, RU94, RU96, RU103, RU104, RU105, RU107, RU109, RU111, RU113, RU114, RU115, RU170, RU112, RU117, RU118, RU119, RU143, RU149, RU150, RU151, RU152, RU153, RU154, RU155, RU159, RU160, RU219, RU217, RU218, RU220, RU221, RU223, RU224, RU225, RU292, RU235, RU236, RU238, RU241, RU243, AU1844, RU298	<i>M. armipes</i> Црна Гора (Дурмитор, Проклетије, Ловћен, Орјен, Румија), Србија (Стара планина, Вршачке планине, Фрушка гора, Копаоник, Ђердап, Голија, Камена Гора, Златибор), Грчка (Драма), Хрватска (Истра, Црес, Крк) и Словенија (Шмарје)	
		<i>M. loewi</i> Грчка (Аркадија Пиндос, Еримантос, Маинало), Р. С. Македонија (Кожуф) и Србија (Ђердап)	<i>M. loewi</i> Балкан
<i>Xan35</i>	RU161	<i>M. loewi</i> Грчка (Еримантос)	
<i>Xan36</i>	RU169		
<i>Xan37</i>	RU177	<i>M. loewi</i> Грчка (Пиндос)	
<i>Xan38</i>	RU259, RU411, RU410, RU412, RU415, RU416	<i>M. loewi</i> Грчка (Лезбос)	<i>M. loewi</i> Егејски архипелаг — Лезбос
<i>Xan39</i>	RU116		
<i>Xan40</i>	RU120	<i>M. loewi</i> Р. С. Македонија (Кожуф)	
<i>Xan41</i>	RU126		
<i>Xan42</i>	RU128, RU129	<i>M. loewi</i> Балкан: Сува планина	<i>M. loewi</i> Балкан
<i>Xan43</i>	RU130		
<i>Xan44</i>	RU135, RU136, RU137, RU138, RU144	<i>M. loewi</i> Србија (Ђердап)	
		<i>M. loewi</i> Србија (Ђердап, Сува планина)	
<i>Xan45</i>	AU954, AU955, AU956, AU957, RU263, RU264, RU265, RU127, RU142, RU145	<i>M. loewi</i> Турска (Испарта)	<i>M. loewi</i> Анатолија — Средоземна регија
<i>Xan46</i>	RU178, RU179, RU180		
<i>Xan47</i>	RU181	<i>M. loewi</i> Турска (Фетије)	<i>M. loewi</i> Анатолија — Егејска регија
		<i>M. loewi</i> Турска (Илгас)	<i>M. loewi</i> Анатолија — Црноморска регија
<i>Xan48</i>	RU182, RU183, RU184, AU960, RU203, RU439, RU441, RU434, RU398	<i>M. lamellatus</i> Турска (Гуцуксу)	<i>M. lamellatus</i>
		<i>M. armipes</i> Анатолија: Илгас	<i>M. armipes</i> Анатолија
		<i>M. papillus</i> Грчка (Лезбос)	<i>M. papillus</i> Егејски архипелаг — Лезбос
		<i>M. papillus</i> Турска (Испарта)	<i>M. papillus</i> Анатолија
<i>Xan49</i>	AU959		
<i>Xan50</i>	RU187		
<i>Xan51</i>	RU351		
<i>Xan52</i>	RU186, RU185	<i>M. hoplitis</i> Црна Гора (Орјен, Ловћен)	<i>M. hoplitis</i>
<i>Xan53</i>	AU1847, AU1846, AU1848		
<i>Xan54</i>	RU191		
<i>Xan55</i>	RU192		
<i>Xan56</i>	RU193, RU194	<i>M. trispinus</i> Турска (Бабадаг, Бондук Даглари, Фетије, Измир)	<i>M. trispinus</i>
<i>Xan57</i>	RU196		
<i>Xan58</i>	RU197, RU198, RU199		
<i>Xan59</i>	RU201, RU202	<i>M. acutus</i> Русија (Кавказ)	<i>M. acutus</i>
<i>Xan60</i>	RU189, RU190	<i>M. fulvitaris</i> Иран	<i>M. fulvitaris</i>
<i>Xan61</i>	AU1820	<i>M. gallicus</i> Француска (Тенде)	<i>M. gallicus</i>
		<i>M. ruficornis</i> Србија (Власина, Копаоник, Фрушка гора), Црна Гора (Дурмитор)	<i>M. ruficornis</i> Балкан
<i>Xan62</i>	RU276, AU1837, AU1836, AU1833, AU1834, RU210, RU424, RU425	<i>M. ruficornis</i> Украјина (Иваново-Франковска област)	<i>M. ruficornis</i> Украјина
<i>Xan63</i>	AU1821		
<i>Xan64</i>	AU1822	<i>M. ruficornis</i> Француска (Тенде)	<i>M. ruficornis</i> Западна Европа
<i>Xan65</i>	AU1831, RU312, RU314, AU1830	<i>M. portschinskyi</i> Грузија (Имеретија)	<i>M. portschinskyi</i>
<i>Xan66</i>	RU432, RU445		
<i>Xan67</i>	RU433		
<i>Xan68</i>	RU435, RU436, RU446	<i>M. ovaloides</i> Турска (Илгас)	<i>M. ovaloides</i>
<i>Xan69</i>	RU440		
<i>Xan70</i>	RU442		
<i>Xan71</i>	RU443		
<i>Xan72</i>	RU437		
<i>Xan73</i>	RU438	<i>M. ilgazense</i> Турска (Илгас)	<i>M. ilgazense</i>
<i>Xan74</i>	RU444		

Табела 6. Основни параметри генетичког диверзитета *Merodon ruficornis* групе врста засновани на секвенцама 5' региона митохондријског *COI* гена.

	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>h</i>	<i>Hd</i>	<i>K</i>	π
1. <i>M. trebevicensis</i>	24	31	9	0,761	10,138	0,01691
2. <i>M. auripes</i>	39	13	11	0,646	2,065	0,00338
3. <i>M. hoplitis</i>	7	4	5	0,857	1,429	0,00234
4. <i>M. trispinus</i>	8	5	6	0,893	1,429	0,00234
5. <i>M. acutus</i>	2	1	2	1,000	1,000	0,00163
6. <i>M. papillus</i>	6	0	1	0	0	0
7. <i>M. armipes</i>	64	27	9	0,531	4,363	0,00719
8. <i>M. loewi</i>	61	16	8	0,442	2,222	0,00364
9. <i>M. fulvitarsis</i>	2	0	1	0	0	0
10. <i>M. ovaloides</i>	9	11	4	0,694	5,111	0,00843
11. <i>M. ilgazenze</i>	3	1	2	0,667	0,667	0,00109
12. <i>M. ruficornis</i>	10	3	2	0,356	1,067	0,00174
13. <i>M. portschinskyi</i>	4	0	1	0	0	0
14. <i>M. gallicus</i>	1	0	1	0	0	0
15. <i>M. lamellatus</i>	1	0	1	0	0	0
<i>M. ruficornis</i> група	241	101	58	0,841	10,945	0,01829

N - број секвенци ; *S* - број полиморфних позиција; *h* - број хаплотипова; *Hd* - диверзитет хаплотипова; *K* - просечан број нуклеотидних разлика; π - диверзитет нуклеотида.

Табела 7. Основни параметри генетичког диверзитета *Merodon ruficornis* групе врста засновани на секвенцама 3' региона митохондријског *COI* гена.

	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>h</i>	<i>Hd</i>	<i>K</i>	π
1. <i>M. trebevicensis</i>	22	28	7	0,816	6,642	0,00890
2. <i>M. auripes</i>	35	24	13	0,832	7,802	0,01048
3. <i>M. hoplitis</i>	7	3	4	0,810	1,048	0,00139
4. <i>M. trispinus</i>	8	7	5	0,857	2,500	0,00333
5. <i>M. acutus</i>	2	0	1	0	0	0
6. <i>M. papillus</i>	6	1	2	0,333	0,333	0,00044
7. <i>M. armipes</i>	61	29	13	0,628	4,811	0,00643
8. <i>M. loewi</i>	60	17	15	0,798	3,012	0,00401
9. <i>M. fulvitarsis</i>	2	0	1	0	0	0
10. <i>M. ovaloides</i>	9	12	6	0,889	5,222	0,00698
11. <i>M. ilgazenze</i>	3	4	3	1,000	2,667	0,00355
12. <i>M. ruficornis</i>	10	3	3	0,378	0,756	0,00100
13. <i>M. portschinskyi</i>	4	0	1	0	0	0
14. <i>M. gallicus</i>	1	0	1	0	0	0
15. <i>M. lamellatus</i>	1	0	1	0	0	0
<i>M. ruficornis</i> група	231	126	74	0,921	14,77	0,02009

N - број секвенци ; *S* - број полиморфних позиција; *h* - број хаплотипова; *Hd* - диверзитет хаплотипова; *K* - просечан број нуклеотидних разлика; π - диверзитет нуклеотида.

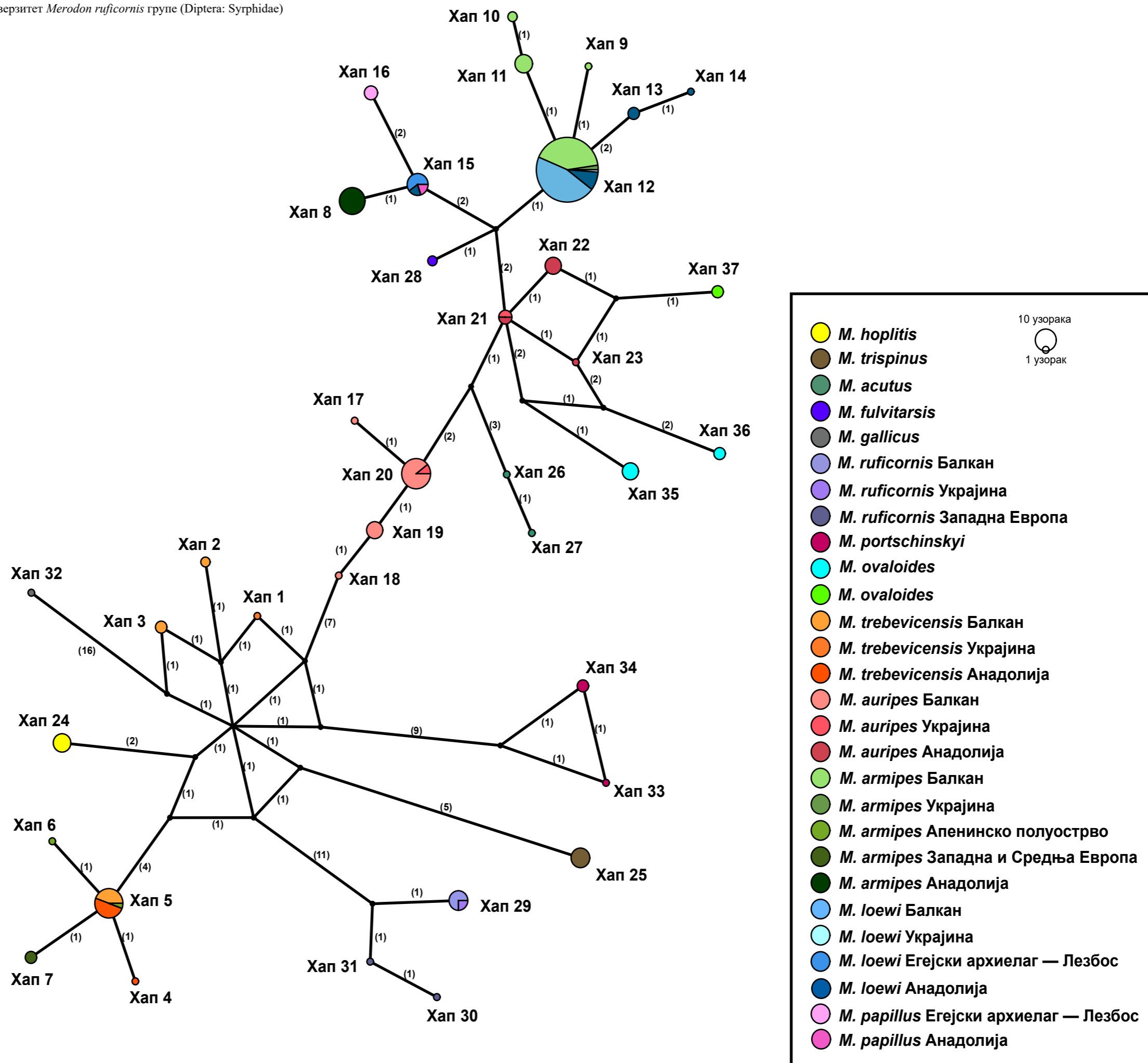
5.1.2. Варијабилност секвенце митохондријског *Cyt b* гена

Сет секвенци *Cyt b* гена укупне дужине 364 bp, бројао је 57 полиморфних позиција (Табела 8). Укупно је дефинисано 37 хаплотипова, при чему је откривено да *M. loewi* дели заједничке хаплотипове са *M. armipes*, али и са јединкама *M. papillus* врсте (Табела 9). Поред тога је уочено да представници врсте *M. trebevicensis* и јединка *M. armipes* пореклом из Италије имају идентичну секвенцу *Cyt b* гена, док је за све остале хаплотипове показано да су специфични за врсту. Додатно су код балканских јединки врста *M. armipes* и *M. auripes* забележени различити хаплотипови у односу на популације пореклом са Анадолијског полуострва (Слика 5). Међутим, унутар врсте *M. trebevicensis* је показано да јединке са Балканског и Анадолијског полуострва деле заједнички хаплотип. Присуство јединствених хаплотипова забележено је и код западноевропских узорака у оквиру врста *M. armipes* и *M. ruficornis*. Испитивањем варијабилности секвенци *Cyt b* гена код *M. ruficornis* групе врста израчунат је диверзитет хаплотипова (Hd) од 0,856, просечан број нуклеотидних разлика (K) од 8,123, као и диверзитет нуклеотида (π) у износу од 0,023 (Табела 8).

Табела 8. Основни параметри генетичког диверзитета *Merodon ruficornis* групе врста засновани на секвенцама митохондријског *Cyt b* гена.

	N	S	h	Hd	K	π
1. <i>M. trebevicensis</i>	24	11	5	0,493	3,293	0,00905
2. <i>M. auripes</i>	39	12	8	0,721	2,255	0,00625
3. <i>M. hoplitis</i>	7	0	1	0	0	0
4. <i>M. trispinus</i>	8	0	1	0	0	0
5. <i>M. acutus</i>	2	1	2	1	1	0,00276
6. <i>M. papillus</i>	6	2	2	0,600	1,200	0,00331
7. <i>M. armipes</i>	64	19	8	0,639	3,742	0,01042
8. <i>M. loewi</i>	61	6	5	0,367	0,992	0,00274
9. <i>M. fulvitaris</i>	2	0	1	0	0	0
10. <i>M. ovaloides</i>	9	4	2	0,500	2,000	0,00554
11. <i>M. ilgazenze</i>	3	0	1	0	0	0
12. <i>M. ruficornis</i>	10	3	3	0,378	0,911	0,00251
13. <i>M. portschinskyi</i>	4	1	2	0,500	0,500	0,00138
14. <i>M. gallicus</i>	1	0	1	0	0	0
<i>M. ruficornis</i> група	240	57	37	0,856	8,123	0,02300

N - број секвенци ; S - број полиморфних позиција; h - број хаплотипова; Hd - диверзитет хаплотипова; K - просечан број нуклеотидних разлика; π - диверзитет нуклеотида.



Слика 5. Median-joining мрежа *Cyt b* хаплотипова *Merodon ruficornis* групе врста.

Табела 9. Преглед хаплотипова *Merodon ruficornis* групе врста дефинисаних на основу секвенци *Cyt b* гена.

<i>Xan1</i>	RU318	<i>M. trebevicensis</i> Украјина (Крим)	<i>M. trebevicensis</i> Украјина
<i>Xan2</i>	RU44, RU274	<i>M. trebevicensis</i> Грчка (Олимп, Фалакро)	<i>M. trebevicensis</i> Балкан
<i>Xan3</i>	FIN27, RU254, RU255	<i>M. trebevicensis</i> Црна Гора (Проклетије) и Србија (Голија)	
<i>Xan4</i>	RU45	<i>M. trebevicensis</i> Турска (Рахат)	<i>M. trebevicensis</i> Анадолија
<i>Xan5</i>	RU41, RU42, RU43, RUT1, RUT2, RUT3, RUT4, RUT5, RU46, RU47, RU48, RU49, RU50, RU51, RU52, RU53, RU54, RU86	<i>M. trebevicensis</i> Србија (Дубашница)	<i>M. trebevicensis</i> Балкан
		<i>M. armipes</i> Италија (Трентино)	<i>M. armipes</i> Апенинско полуострво
<i>Xan6</i>	RU87		
<i>Xan7</i>	AU1823, RU79	<i>M. armipes</i> Француска (Монклар) и Немачка	<i>M. armipes</i> Западна и Средња Европа
<i>Xan8</i>	RU449, RU450, RU451, RU448, RU453, RU465, RU466, RU467, RU468, RU469, RU471, RU472, RU473, RU434	<i>M. armipes</i> Турска (Болу, Илгаз)	<i>M. armipes</i> Анадолија
<i>Xan9</i>	RU111	<i>M. armipes</i> Грчка (Драма)	
<i>Xan10</i>	RU101, RU106	<i>M. armipes</i> Србија (Ђердап)	<i>M. armipes</i> Балкан
<i>Xan11</i>	RU102, RU103, RU104, RU105, RU107, RU109, RU14	<i>M. loewi</i> Балкан Србија (Ђердап)	
<i>Xan12</i>	AU1844, RU81, RU298, RU90, RU88, RU89, RU92, RU93, RU94, RU96, RU112, RU113, RU115, RU188, RU235, RU236, RU237, RU238, RU241, RU243, RU80, RU82, RU83, RU114, RU224, RU219, RU217, RU218, RU220, RU221, RU223, RU225, RU85, RU292, RU325, RU326, RU116, RU117, RU118, RU119, RU120, RU126, RU127, RU129, RU130, RU128, RU145, RU135, RU136, RU138, RU142, RU144, RU137, RU152, RU157, RU150, RU149, RU151, RU153, RU154, RU155, RU159, RU160, RU161, RU409, RU175, RU167, RU168, RU169, RU170, RU171, RU173, RU172, RU174, RU176, RU177, AU953, AU954, AU955, AU956, AU957, RU263, RU264, RU265, RU328	<i>M. loewi</i> Грчка (Пиндос, Еримантос, Маиноло, Аркадија), Р. С. Македонија (Кожуф), и Србија (Ђердап, Сува планина)	<i>M. loewi</i> Балкан
		<i>M. loewi</i> Украјина (Одешка област)	<i>M. loewi</i> Украјина
		<i>M. loewi</i> Турска (Испарта)	<i>M. loewi</i> Анадолија — Средоземна регија
		<i>M. armipes</i> Црна Гора (Дурмитор, Проклетије, Ловћен, Орјен, Румија), Србија (Стара планина, Вршачке планине, Фрушка гора, Копоник, Ђердап, Голија, Камена Гора, Златибор), Грчка (Драма), Хрватска (Истра, Црес, Крк) и Словенија (Шмарје)	<i>M. armipes</i> Балкан
		<i>M. armipes</i> Украјина (Одешка област)	<i>M. armipes</i> Украјина
<i>Xan13</i>	RU178, RU181, RU180	<i>M. loewi</i> Турска (Фетије)	<i>M. loewi</i> Анадолија — Егејска регија
<i>Xan14</i>	RU179	<i>M. loewi</i> Турска (Илгаз)	<i>M. loewi</i> Анадолија — Црноморска регија
<i>Xan15</i>	RU439, RU441, RU259, RU410, RU412, RU415, RU416, AU959, AU960	<i>M. loewi</i> Грчка (Лезбос)	<i>M. loewi</i> Егејски архипелаг — Лезбос
		<i>M. rapillus</i> Турска (Испарта)	<i>M. rapillus</i> Анадолија
<i>Xan16</i>	RU182, RU183, RU184, RU398	<i>M. rapillus</i> Грчка (Лезбос)	<i>M. rapillus</i> Егејски архипелаг — Лезбос
<i>Xan17</i>	RU55	<i>M. auripes</i> Црна Гора (Дурмитор)	
<i>Xan18</i>	RU59		
<i>Xan19</i>	RU286, RU421, RU422, RU58, RU56, RU57	<i>M. auripes</i> Грчка (Драма) и Србија (Мироч)	<i>M. auripes</i> Балкан
<i>Xan20</i>	RU65, RU66, RU60, RU61, RU62, RU63, RU64, RU688, RU67, AU1828, RU287, RU290, RU279, RU280, RU283, RU284, RU69, RU322	<i>M. auripes</i> Грчка (Маиноло, Пиндос) и Црна Гора (Ловћен, Маглић)	
		<i>M. auripes</i> Украјина (Одешка област)	<i>M. auripes</i> Украјина — Одешка област
<i>Xan21</i>	RU323, RU324, RU70, RU71	<i>M. auripes</i> Украјина (Запорошка област)	<i>M. auripes</i> Украјина — Запорошка област
<i>Xan22</i>	RU76, RU77, RU72, RU73, RU74, RU78	<i>M. auripes</i> Турска (Боздаг)	<i>M. auripes</i> Анадолија
<i>Xan23</i>	RU447	<i>M. auripes</i> Турска (Болу)	
<i>Xan24</i>	RU185, RU187, RU186, AU1848, AU1846, AU1847, RU351	<i>M. hoplitis</i> Црна Гора (Орјен, Ловћен)	<i>M. hoplitis</i>
<i>Xan25</i>	RU191, RU192, RU193, RU194, RU196, RU197, RU198, RU199	<i>M. trispinus</i> Турска (Бабадаг, Бонцук Даглари, Фетије, Измир)	<i>M. trispinus</i>
<i>Xan26</i>	RU201	<i>M. acutus</i> Русија (Кавказ)	<i>M. acutus</i>
<i>Xan27</i>	RU202		
<i>Xan28</i>	RU189, RU190	<i>M. fulvitaris</i> Иран	<i>M. fulvitaris</i>
<i>Xan29</i>	AU1833, AU1834, RU210, RU276, RU424, RU425, AU1836, AU1837	<i>M. ruficornis</i> Србија (Власина, Копоник, Фрушка гора), Црна Гора (Дурмитор)	<i>M. ruficornis</i> Балкан
		<i>M. ruficornis</i> Украјина (Иваново-Франковска област)	<i>M. ruficornis</i> Украјина
<i>Xan30</i>	AU1821	<i>M. ruficornis</i> Француска (Тенде)	<i>M. ruficornis</i> Западна Европа
<i>Xan31</i>	AU1822		
<i>Xan32</i>	AU1820	<i>M. gallicus</i> Француска (Тенде)	<i>M. gallicus</i>
<i>Xan33</i>	RU314	<i>M. portschinskyi</i> Грузија (Имеретија)	<i>M. portschinskyi</i>
<i>Xan34</i>	RU312, AU1830, AU1831		
<i>Xan35</i>	RU443, RU446, RU433, RU435, RU442, RU436	<i>M. ovaloides</i> Турска (Илгаз)	<i>M. ovaloides</i>
<i>Xan36</i>	RU445, RU432, RU440		
<i>Xan37</i>	RU438, RU444, RU437	<i>M. ilgazenze</i> Турска (Илгаз)	<i>M. ilgazenze</i>

5.1.3. Варијабилност једарног 28S рРНК гена

Након поравнавања, дужина матрице секвенци 28S рРНК гена износила је 572 bp, од чега је за 13 нуклеотидних позиција утврђено да представљају полиморфна места. Укупан број од 12 генотипова је дефинисан само на основу нуклеотидних секвенци, третирајући нуклеотидне празнине настале инсерцијама и делецијама (индел позиције) као недостајуће податке (Табела 10а). Откривено је девет јединствених генотипова, од којих два одговарају врсти *M. loewi*, три су јединствена за *M. auripes*, као и по један за сваку од следећих врста: *M. fulvitaris*, *M. acutus*, *M. gallicus* и *M. armipes* из Западне Европе. Насупрот томе, за генотип 1 је показано да је дељен између врста *M. trebevicensis*, *M. loewi*, *M. armipes*, *M. papillus*, *M. hoplitis*, *M. ruficornis*, *M. ovaloides* и *M. ilgazenze*. Генотип 4 уочен је код припадника *M. loewi* и *M. trispinus*, док је генотип 8 забележен код врста *M. portschinskyi* и *M. ruficornis*.

Са друге стране, анализом 28S рРНК секвенци заједно са инделима унутар њих, откривено је 18 генотипова (Табела 10б), који су за разлику од митохондријских хаплотипова успешно раздвојили јединке *M. loewi* од *M. armipes* и *M. papillus*, али и од свих осталих врста (Слика 6). Тако да је шест генотипова специфично присутно код врсте *M. loewi*. Међутим, врсте *M. trebevicensis*, *M. papillus*, *M. hoplitis*, *M. ovaloides*, *M. ilgazenze* су имале заједнички генотип 1, *M. portschinskyi* и *M. ruficornis* генотип 5, а *M. armipes* са врстом *M. ruficornis* генотип 6. Испитивањем варијабилности секвенци је на нивоу групе одређен диверзитет генотипова (Gd) који износи 0,499, просечан број нуклеотидних разлика (K) од 0,778 и нуклеотидни диверзитет (π) у вредности од 0,00138 (Табела 11); док су следећи параметри диверзитета израчунати на основу инсерција и делеција унутар 28S рРНК гена: диверзитет генотипова ($Gd(i)$) који износи 0,775, диверзитет индела ($K(i)$) од 1,288, док је за диверзитет индела по позицији ($\pi(i)$) израчуната вредност од 0,00225 (Табела 12).

Табела 10. Преглед генотипова *Merodon ruficornis* групе врста дефинисаних на основу 28S рРНК гена.

Г

а) Генотипови дефинисани на основу нуклеотидних секвенци 28S рРНК гена, третирајући нуклеотидне празнине настале инсерцијама и делецијама као непостојеће податке.

Ген1	RU41, RU42, RU43, RU80, RU81, RU82, RU83, RU325, RU326, RU85, RU175, RU178, RU179, RU180, AU954, AU955, AU956, AU957, RU263, RU264, RU265, RU186, AU1847, AU1846, AU1848, RU164, RU167, RU168, RU169, RU172, RU173, RU174, RU171, RU176, RU177, RU181, RU182, RU183, RU184, AU959, AU960, RU185, RU187, RU351, RU188, RUT1, RUT2, RUT3, RUT4, RUT5, RU45, RU46, RU47, RU48, RU49, RU50, RU51, RU52, RU53, RU54, RU88, RU89, RU90, RU92, RU93, RU94, RU237, RU96, RU101, RU102, RU103, RU104, RU105, RU106, RU107, RU109, RU111, RU113, RU114, RU115, RU170, RU112, RU120, RU130, RU135, RU136, RU137, RU138, RU142, RU143, RU144, RU145, RU149, RU150, RU151, RU152, RU153, RU154, RU155, RU159, RU160, RU161, RU328, RU219, RU217, RU218, RU220, RU221, RU223, RU218, RU224, RU225, RU292, RU235, RU236, RU238, RU241, RU243, RU254, RU274, RU255, AU1844, RU276, AU2837, AU1836, AU1833, AU1834, RU298, RU318, RU210, RU86, RU87, FIN27, RU44, RU432, RU433, RU435, RU436, RU437, RU438, RU439, RU441, RU440, RU442, RU443, RU444, RU445, RU446, RU448, RU434, RU449, RU450, RU451, RU453, RU466, RU465, RU467, RU468, RU469, RU471, RU472, RU473, RU398, RU424, RU425	<i>M. trebevicensis</i> Србија (Дубашница, Голија), Црна Гора (Проклетије) и Грчка (Олимп, Фалакро)	<i>M. trebevicensis</i> Балкан
		<i>M. trebevicensis</i> Украјина (Крим)	<i>M. trebevicensis</i> Украјина
		<i>M. trebevicensis</i> Турска (Рахат)	<i>M. trebevicensis</i> Анадолија
		<i>M. armipes</i> Украјина (Одешка област)	<i>M. armipes</i> Украјина
		<i>M. armipes</i> Грчка (Драма), Црна Гора (Дурмитор, Орјен, Румија, проклетије), Србија (Стара планина, Вршачке планине, Ђердап, Копаоник, Златибор, Камена Гора, Голија, Фрушка гора), Хрватска (Крк, Црес, Истра), Словенија (Шмарје)	<i>M. armipes</i> Балкан
		<i>M. armipes</i> Италија (Трентино)	<i>M. armipes</i> Апенинско полуострво
		<i>M. armipes</i> Турска (Болу, Илгаз)	<i>M. armipes</i> Анадолија
		<i>M. ruficornis</i> Србија (Власина, Копаоник, Фрушка гора), Црна Гора (Дурмитор)	<i>M. ruficornis</i> Балкан
		<i>M. ruficornis</i> Украјина (Иваново-Франковска област)	<i>M. ruficornis</i> Украјина
		<i>M. ovaloides</i> Турска (Илгаз)	<i>M. ovaloides</i>
		<i>M. ilgazenze</i> Турска (Илгаз)	<i>M. ilgazenze</i>
		<i>M. papillus</i> Грчка (Лезбос)	<i>M. papillus</i> Егејски архипелаг — Лезбос
		<i>M. papillus</i> Турска (Испарта)	<i>M. papillus</i> Анадолија
		<i>M. hoplitis</i> Црна Гора (Орјен, Ловћен)	<i>M. hoplitis</i>
		<i>M. loewi</i> Грчка (Пиндос, Еримантос, Аркадија, Маиноло), Р. С. Македонија (Кожуф), Србија (Ђердап)	<i>M. loewi</i> Балкан
		<i>M. loewi</i> Украјина (Одешка област)	<i>M. loewi</i> Украјина
<i>M. loewi</i> Турска (Испарта, Фетије, Илгаз)	<i>M. loewi</i> Анадолија		
Ген2	RU259, RU411, RU210, RU412, RU415, RU416	<i>M. loewi</i> Грчка (Лезбос)	<i>M. loewi</i> Егејски архипелаг — Лезбос
Ген3	RU165	<i>M. loewi</i> Грчка (Пиндос)	
Ген4	RU191, RU192, RU193, RU194, RU196, RU197, RU198, RU199, RU116, RU117, RU118, RU119, RU126, RU127, RU128, RU129	<i>M. loewi</i> Р. С. Македонија (Кожуф), Србија (Сува планина)	<i>M. loewi</i> Балкан
		<i>M. trispinus</i> Турска (Бабадаг, Бонцук Даглари, Фетије, Измир)	<i>M. trispinus</i>
Ген5	RU65, RU66, RU60, RU61, RU62, RU63, RU64, RU68,	<i>M. auripes</i> Грчка (Маинало)	<i>M. auripes</i> Балкан — Пелопонез
Ген6	RU58, RU56, RU57, RU59, RU323, RU324, RU55, RU70, RU71, RU280, RU283, RU284, RU279, RU286, RU287, RU290, AU1828, RU447, RU452, RU421, RU422	<i>M. auripes</i> Грчка (Драма), Србија (Ђердап, Мироч) и Црна Гора (Дурмитор, Маглић, Ловћен, Мироч)	<i>M. auripes</i> Балкан и Украјина — Запорошка област
		<i>M. auripes</i> Украјина (Запорошка област)	
		<i>M. auripes</i> Турска (Баликесир, Болу)	<i>M. auripes</i> Анадолија
Ген7	RU76, RU77, RU73, RU74, RU78, RU72	<i>M. auripes</i> Турска (Боздаг)	<i>M. auripes</i> Анадолија — Егејска Регија
Ген8	AU1821, AU1822, AU1831, AU312, AU314, AU1830	<i>M. ruficornis</i> Француска (Тенде)	<i>M. ruficornis</i> Западна Европа
		<i>M. portschinskyi</i> Грузија (Имеретија)	<i>M. portschinskyi</i>
Ген9	RU189, RU190	<i>M. fulvitaris</i> Иран	<i>M. fulvitaris</i>
Ген10	RU201, RU202	<i>M. acutus</i>	<i>M. acutus</i>
Ген11	AU1823, AU1824	<i>M. armipes</i> Француска (Монклар)	<i>M. armipes</i> Западна Европа
Ген12	AU1820	<i>M. gallicus</i> Француска (Тенде)	<i>M. gallicus</i>

б) Генотипови дефинисани на основу нуклеотидне секвенце 28S рРНК гена заједно са инделима.

Ген1	RU41, RU42, RU43, RU186, RU182, RU183, RU184, RU185, RU187, RUT1, RUT2, RUT3, RUT4, RUT5, RU45, RU46, RU47, RU48, RU49, RU50, RU51, RU52, RU53, RU54, AU1847, AU1846, AU1848, AU959, AU960, RU351, RU254, RU274, RU255, RU318, RU44, FIN27, RU432, RU433, RU435, RU436, RU437, RU438, RU440, RU442, RU443, RU444, RU445, RU446, RU398	<i>M. trebevicensis</i> Србија (Дубашница, Голија), Црна Гора (Проклетије) и Грчка (Олимп, Фалакро)	<i>M. trebevicensis</i> Балкан
		<i>M. trebevicensis</i> Украјина (Крим)	<i>M. trebevicensis</i> Украјина
		<i>M. trebevicensis</i> Турска (Рахат)	<i>M. trebevicensis</i> Анадолија
		<i>M. hoplitis</i> Црна Гора (Орјен, Ловћен)	<i>M. hoplitis</i>
		<i>M. ovaloides</i> Турска (Илгаз)	<i>M. ovaloides</i>
		<i>M. ilgazenze</i> Турска (Илгаз)	<i>M. ilgazenze</i>
		<i>M. papillus</i> Турска (Испарта)	<i>M. papillus</i> Анадолија
		<i>M. papillus</i> Грчка (Лезбос)	<i>M. papillus</i> Егејски архипелаг — Лезбос
Ген2	RU65, RU66, RU60, RU61, RU62, RU63, RU64, RU68	<i>M. auripes</i> Грчка (Маинало)	<i>M. auripes</i> Балкан — Пелопонез
Ген3	RU58, RU59, RU56, RU57, RU323, RU324, RU55, RU70, RU71, RU280, RU283, RU284, RU279, RU286, RU287, RU290, AU1828, RU447, RU452, RU421, RU422	<i>M. auripes</i> Грчка (Драма), Србија (Ђердап, Мироч) и Црна Гора (Дурмитор, Маглић, Ловћен, Мироч)	<i>M. auripes</i> Балкан и Украјина — Запорошка област
		<i>M. auripes</i> Украјина (Запорошка област)	
		<i>M. auripes</i> Турска (Баликесир, Болу)	<i>M. auripes</i> Анадолија
Ген4	RU76, RU77, RU73, RU74, RU78, RU72	<i>M. auripes</i> Турска (Боздаг)	<i>M. auripes</i> Анадолија — Егејска Регија
Ген5	AU1821, AU1822, AU1831, RU312, RU314, AU1830	<i>M. portschinskyi</i> Грузија (Имеретија)	<i>M. portschinskyi</i>
		<i>M. ruficornis</i> Француска (Тенде)	<i>M. ruficornis</i> Западна Европа
Ген6	RU80, RU81, RU82, RU83, RU188, RU88, RU89, RU90, RU92, RU93, RU94, RU96, RU101, RU102, RU103, RU104, RU105, RU106, RU107, RU109, RU111, RU113, RU114, RU115, RU112, RU325, RU326, RU237, RU235, RU236, RU238, RU241, RU243, AU1844, RU276, AU1837, AU1836, AU1833, AU1834, RU298, RU210, RU448, RU434, RU449, RU450, RU451, RU453, RU466, RU465, RU467, RU468, RU469, RU471, RU472, RU473, RU424, RU425	<i>M. ruficornis</i> Србија (Власина, Копаоник, Фрушка гора), Црна Гора (Дурмитор)	<i>M. ruficornis</i> Балкан
		<i>M. ruficornis</i> Украјина (Иваново-Франковска област)	<i>M. ruficornis</i> Украјина
		<i>M. armipes</i> Турска (Болу, Илгаз)	<i>M. armipes</i> Анадолија
		<i>M. armipes</i> Украјина (Одешка област)	<i>M. armipes</i> Украјина
		<i>M. armipes</i> Грчка (Драма), Црна Гора (Дурмитор, Орјен, Румија, проклетије), Србија (Стара планина, Вршачке планине, Ђердап, Копаоник, Златибор, КАмена Гора, Голија, Фрушка гора)	<i>M. armipes</i> Балкан
Ген7	RU085, RU219, RU217, RU218, RU220, RU221, RU223, RU224, RU225, RU292, RU86, RU87	<i>M. armipes</i> Хрватска (Крк, Црес, Истра), Словенија (Шмарје)	<i>M. armipes</i> Балкан — северно приобаље Јадрана
		<i>M. armipes</i> Италија (Трентино)	<i>M. armipes</i> Апенинско полуострво
Ген8	AU1823, AU1824	<i>M. armipes</i> Француска (Монклар)	<i>M. armipes</i> Западна Европа
Ген9	RU165	<i>M. loewi</i> Грчка (Пиндос)	
Ген10	RU116, RU117, RU118, RU119, RU126, RU127, RU128, RU129	<i>M. loewi</i> Р. С. Македонија (Кожуф), Србија (Сува планина)	<i>M. loewi</i> Балкан
Ген11	RU259, RU411, RU410, RU412, RU415, RU416	<i>M. loewi</i> Грчка (Лезбос)	<i>M. loewi</i> Егејски архипелаг — Лезбос
Ген12	RU135, RU136, RU137, RU138, RU142, RU143, RU144, RU145, RU263, RU264, RU265, RU328	<i>M. loewi</i> Турска (Испарта)	<i>M. loewi</i> Анадолија
		<i>M. loewi</i> Украјина (Одешка област)	<i>M. loewi</i> Украјина
		<i>M. loewi</i> Србија (Ђердап)	
Ген13	RU175, RU164, RU167, RU168, RU169, RU172, RU173, RU174, RU171, RU176, RU177, RU170, RU120, RU130, RU149, RU150, RU151, RU152, RU153, RU154, RU155, RU159, RU160, RU161, AU954, AU955, AU956, AU95,	<i>M. loewi</i> Грчка (Пиндос, Еримантос, Аркадија, Маиноло), Р. С. Македонија (Кожуф) и Србија (Сува планина, Ђердап)	<i>M. loewi</i> Балкан
		<i>M. loewi</i> Турска (Испарта)	<i>M. loewi</i> Анадолија
Ген14	RU178, RU179, RU180, RU181, RU439, RU441	<i>M. loewi</i> Турска (Илгаз, Фетије)	
Ген15	RU191, RU192, RU193, RU194, RU196, RU197, RU198, RU199	<i>M. trispinus</i> Турска (Бабадаг, Бонцук Даглари, Фетије, Измир)	<i>M. trispinus</i>
Ген16	RU201, RU202	<i>M. acutus</i> Русија (Кавказ)	<i>M. acutus</i>
Ген17	RU189, RU190	<i>M. fulvitaris</i> Иран	<i>M. fulvitaris</i>
Ген18	AU1820	<i>M. gallicus</i> Француска (Тенде)	<i>M. gallicus</i>

Табела 11. Основни параметри генетичког диверзитета *Merodon ruficornis* групе врста засновани на секвенцама једарног 28S рРНК гена.

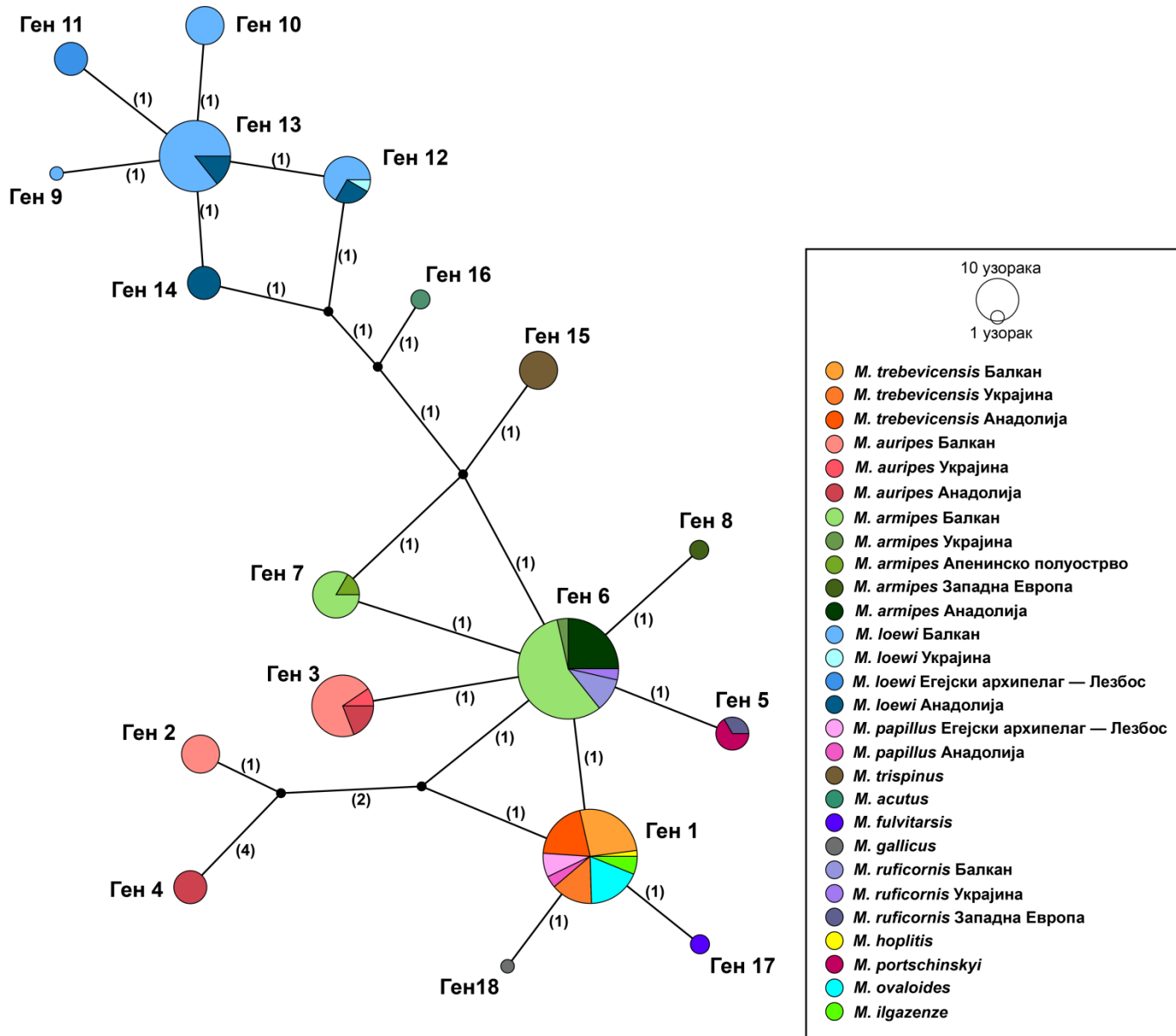
	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>g</i>	<i>Gd</i>	<i>K</i>	π
1. <i>M. trebevicensis</i>	24	0	1	0	0	0
2. <i>M. auripes</i>	35	6	3	0,568	2,731	0,00404
3. <i>M. hoplitis</i>	7	0	1	0	0	0
4. <i>M. trispinus</i>	8	0	1	0	0	0
5. <i>M. acutus</i>	2	0	1	0	0	0
6. <i>M. papillus</i>	6	0	1	0	0	0
7. <i>M. armipes</i>	63	2	2	0,093	0,094	0,00017
8. <i>M. loewi</i>	61	3	4	0,394	0,424	0,00075
9. <i>M. fulvitaris</i>	2	0	1	0	0	0
10. <i>M. ovaloides</i>	9	0	1	0	0	0
11. <i>M. ilgazenze</i>	3	0	1	0	0	0
12. <i>M. ruficornis</i>	10	1	2	0,356	0,356	0,00063
13. <i>M. portschinskyi</i>	4	0	1	0	0	0
14. <i>M. gallicus</i>	1	0	1	0	0	0
<i>M. ruficornis</i> група	235	13	12	0,499	0,778	0,00138

N - број секвенци ; *S* - број полиморфних позиција; *g* - број генотипова; *Gd* - диверзитет генотипова; *K* - просечан број нуклеотидних разлика; π - диверзитет нуклеотида.

Табела 12. Основни параметри генетичког диверзитета *Merodon ruficornis* групе врста засновани на варијабилности насталој услед инсерција и делеција унутар секвенце једарног 28S рРНК гена.

	<i>N</i>	<i>I</i>	<i>g(i)</i>	<i>Gd(i)</i>	<i>K(i)</i>	$\pi(i)$
1. <i>M. trebevicensis</i>	24	0	1	0	0	0
2. <i>M. auripes</i>	35	2	3	0,568	0,758	0,00123
3. <i>M. hoplitis</i>	7	0	1	0	0	0
4. <i>M. trispinus</i>	8	0	1	0	0	0
5. <i>M. acutus</i>	2	0	1	0	0	0
6. <i>M. papillus</i>	6	0	1	0	0	0
7. <i>M. armipes</i>	63	2	2	0,313	0,627	0,00111
8. <i>M. loewi</i>	61	2	3	0,468	0,508	0,00089
9. <i>M. fulvitaris</i>	2	0	1	0	0	0
10. <i>M. ovaloides</i>	9	0	1	0	0	0
11. <i>M. ilgazenze</i>	3	0	1	0	0	0
12. <i>M. ruficornis</i>	10	0	1	0	0	0
13. <i>M. portschinskyi</i>	4	0	1	0	0	0
14. <i>M. gallicus</i>	1	0	1	0	0	0
<i>M. ruficornis</i> група	235	8	9	0,775	1,288	0,00225

N – број секвенци; *I* – број индела; *g(i)* – број генотипова; *Gd(i)* – диверзитет генотипова; *K(i)* – просечан број разлика заснованих на инделима; $\pi(i)$ – диверзитет индела по појединачној позицији унутар секвенце.



Слика 6. Median-joining мрежа 28S рДНК генотипова *Merodon ruficornis* групе врста.

5.1.4. Варијабилност једарног *ITS2* региона

Дужина матрице поравнатих секвенци *ITS2* региона износила је 370 бр. Откривено је 7 полиморфних нуклеотидних позиција, на основу којих је дефинисано 9 генотипова (Табела 13а). Јединствени генотипови су забележени код врста *M. acutus*, *M. auripes*, *M. loewi* и *M. ruficornis*, док је генотип 1 дељен између врста *M. ilgazenze* и *M. loewi*, затим је генотип IV откривен код врста *M. armipes*, *M. auripes*, *M. hoplitis*, *M. ovaloides*, *M. papillus*, *M. fulvitaris*, *M. loewi* и *M. trebevicensis*. Присуство заједничког генотипа 5 је такође уочено код врста *M. trebevicensis* и *M. gallicus*, али и код *M. portschinskyi* која исту нуклеотидну секвенцу дели са узорцима *M. ruficornis* врсте (генотип 8).

Узимање у обзир информација које су добијене на основу инсерција и делеција је, слично као и код 28S рРНК гена, омогућило додатну резолуцију у откривању специфичних генотипова за врсте (Табела 13б). Тако су на основу *ITS2* секвенци заједно са инделима унутар њих дефинисана 22 генотипа, која су раздвојила све анализиране врсте, осим *M. ovaloides* и *M. papillus* које имају заједнички генотип 19. Поред тога су на основу генотипова уочене разлике између турских и балканских популација у оквиру врста *M. loewi*, *M. trebevicensis* и *M. auripes*, али и раздвојени узорци *M. ruficornis* врсте пореклом са Балкана, из Украјине и Западне Европе (Слика 7). Поред тога, испитивањем варијабилности секвенци је на нивоу групе одређен диверзитет генотипова (Gd) који износи 0,681, просечан број нуклеотидних разлика (K) од 1,182 и нуклеотидни диверзитет (π) у вредности од 0,0038 (Табела 14); док су следећи параметри диверзитета израчунати на основу инсерција и делеција унутар *ITS2* региона: диверзитет генотипова ($Gd(i)$) који износи 0,876, диверзитет индела ($K(i)$) од 3,551, док је за диверзитет индела по позицији ($\pi(i)$) израчуната вредност од 0,00962 (Табела 15).

Табела 13. Преглед генотипова *Merodon ruficornis* групе врста дефинисаних на основу *ITS2* региона.

а) Генотипови дефинисани на основу нуклеотидних секвенци *ITS2* региона, третирајући нуклеотидне празнине настале инсерцијама и делецијама као непостојеће податке.

Ген1	RU135, RU136, RU137, RU138, RU142, RU143, RU144, RU145, RU444, RU437, RU438	<i>M. ilgazense</i> Турска (Илгаз)	<i>M. ilgazense</i>
		<i>M. loewi</i> Србија (Ђердап)	<i>M. loewi</i> Балкан — Ђердап
Ген2	RU175, RU164, RU165, RU167, RU168, RU169, RU172, RU173, RU174, RU171, RU176, RU177, RU170, RU116, RU117, RU118, RU119, RU120, RU126, RU127, RU128, RU129, RU130, RU149, RU150, RU151, RU152, RU153, RU154, RU155, RU159, RU160, RU161, RU259, RU410, RU411, RU412, RU415, RU416	<i>M. loewi</i> Грчка (Пиндос, Еримантос, Аркадија, Маиноло), Р. С. Македонија (Кожуф), Србија (Сува планина)	<i>M. loewi</i> Балкан
		<i>M. loewi</i> Грчка (Лезбос)	<i>M. loewi</i> Егејски архипелаг — Лезбос
Ген3	AU954, AU955, AU956, AU957, RU263, RU264, RU265	<i>M. loewi</i> Турска (Испарта)	<i>M. loewi</i> Анадолија — Средоземна регија
Ген4	RU41, R042, RU43, RU65, RU66, RU68, RU60, RU61, RU62, RU63, RU64, RU80, R081, RU82, RU83, AU1844, RU434, RU448, RU449, RU450, RU451, RU465, RU466, RU467, RU468, RU469, RU471, RU472, RU473, RU453, RU85, RU178, RU179, RU180, RU186, RU181, RU182, RU183, RU184, RU185, RU187, RU351, RU188, RU189, RUT1, RUT2, RUT3, RUT4, RUT5, RU190, R070, RU71, RU447, RU452, RU88, RU89, RU90, RU092, RU93, RU94, RU237, RU235, RU96, RU101, RU102, RU103, RU104, RU105, RU106, RU107, RU109, RU111, RU113, RU114, RU115, RU112, AU1823, AU1824, RU219, RU217, RU218, RU220, RU221, RU223, RU224, RU225, RU292, RU236, RU238, RU241, RU243, RU254, RU255, RU274, RU44, RU318, RU298, RU79, RU86, RU87, RU432, RU433, RU435, RU436, RU440, RU442, RU443, RU445, RU446	<i>M. loewi</i> Турска (Фетије)	<i>M. loewi</i> Анадолија — Егејска регија
		<i>M. armipes</i> Грчка (Драма), Црна Гора (Дурмитор, Орјен, Румија, Проклетије), Србија (Стара планина, Вршачке планине, Ђердап, Копаоник, Златибор, Камена Гора, Голија, Фрушка гора), Хрватска (Крк, Црес, Истра), Словенија (Шмарје)	<i>M. armipes</i> Балкан
		<i>M. armipes</i> Италија (Трентино) и Немачка	<i>M. armipes</i> Апенинско полуострво и Средња Европа
		<i>M. armipes</i> Француска (Монклар)	<i>M. armipes</i> Западна Европа
		<i>M. armipes</i> Турска (Болу, Илгаз)	<i>M. armipes</i> Анадолија
		<i>M. auripes</i> Грчка (Маиноло)	<i>M. auripes</i> Балкан — Пелопонез
		<i>M. auripes</i> Турска (Баликесир, Болу)	<i>M. auripes</i> Анадолија
		<i>M. ovaloides</i> Турска (Илгаз)	<i>M. ovaloides</i>
		<i>M. hoplitis</i> Црна Гора (Орјен, Ловћен)	<i>M. hoplitis</i>
		<i>M. papillus</i> Грчка (Лезбос)	<i>M. papillus</i> Егејски архипелаг — Лезбос
		<i>M. fulvitaris</i> Иран	<i>M. fulvitaris</i>
		<i>M. trebevicensis</i> Србија (Дубашница, Голија) и Грчка (Олимп, Фалакро)	<i>M. trebevicensis</i> Балкан
		<i>M. trebevicensis</i> Украјина (Крим)	<i>M. trebevicensis</i> Украјина
Ген5	RU45, RU46, RU47, RU48, RU49, RU50, RU51, RU52, RU53, RU54, AU1820	<i>M. trebevicensis</i> Турска (Рахат)	<i>M. trebevicensis</i> Анадолија
		<i>M. gallicus</i> Француска (Тенде)	<i>M. gallicus</i>
Ген6	RU058, RU059, RU56, RU57, RU323, RU324, RU55, RU279, RU280, RU283, RU284, RU290, RU421, RU422, RU286, RU287, RU067, RU69, AU1828	<i>M. auripes</i> Грчка (Драма, Пиндос), Србија (Ђердап, Мироч) и Црна Гора (Маглић, Ловћен, Дурмитор)	<i>M. auripes</i> Балкан и Украјина — Запорошка област
		<i>M. auripes</i> Украјина (Запорошка област)	
Ген7	AU1837, AU1836, AU1833, AU1834, RU276, RU210, RU424, RU425	<i>M. ruficornis</i> Србија (Власина, Копаоник, Фрушка гора), Црна Гора (Дурмитор)	<i>M. ruficornis</i> Балкан
		<i>M. ruficornis</i> Украјина (Иваново-Франковска област)	<i>M. ruficornis</i> Украјина
Ген8	AU1821, AU1822, RU312, RU314, AU1831, AU1830	<i>M. ruficornis</i> Француска (Тенде)	<i>M. ruficornis</i> Западна Европа
		<i>M. portschinskyi</i> Грузија (Имеретија)	<i>M. portschinskyi</i>
Ген9	RU201, RU202	<i>M. acutus</i> Русија (Кавказ)	<i>M. acutus</i>

б) Генотипови дефинисани на основу нуклеотидне секвенце *ITS2* региона заједно са инделима.

Ген1	RU444, RU437, RU438	<i>M. ilgazenze</i> Турска (Илгаз)	<i>M. ilgazenze</i>
Ген2	RU175, RU164, RU165, RU167, RU168, RU169, RU172, RU173, RU174, RU171, RU176, RU177, RU170, RU116, RU117, RU118, RU119, RU120, RU126, RU127, RU128, RU129, RU130, RU149, RU150, RU151, RU152, RU153, RU154, RU155, RU159, RU160, RU161, RU259, RU410, RU411, RU412, RU415, RU416	<i>M. loewi</i> Грчка (Лезбос)	<i>M. loewi</i> Егејски архипелаг — Лезбос
		<i>M. loewi</i> Грчка (Пиндос, Еримантос, Аркадија, Маиноло), Р. С. Македонија (Кожуф), Србија (Сува планина)	<i>M. loewi</i> Балкан
Ген3	RU135, RU136, RU137, RU128, RU142, RU143, RU144, RU145	<i>M. loewi</i> Србија (Ђердап)	<i>M. loewi</i> Балкан — Ђердап
Ген4	RU178, RU179, RU180, RU181	<i>M. loewi</i> Турска (Фетије)	<i>M. loewi</i> Анадолија — Егејска регија
Ген5	AU954, AU955, AU956, AU957, RU263, RU264, RU265	<i>M. loewi</i> Турска (Испарта)	<i>M. loewi</i> Анадолија — Средоземна регија
Ген6	RU92, RU93, RU237, RU235, RU96, RU101, RU102, RU103, RU104, RU105, RU106, RU107, RU109, RU111, RU113, RU114, RU115, RU112, AU1823, AU1824, RU236, AU241, RU298	<i>M. armipes</i> Француска (Монклар)	<i>M. armipes</i> Западна Европа
		<i>M. armipes</i> Грчка (Драма), Црна Гора (Румија), Србија (Стара планина, Вршачке планине, Ђердап, Копаоник, Камена Гора, Фрушка гора)	<i>M. armipes</i> Балкан
Ген7	RU80, RU81, RU82, RU83, AU1844, RU434, RU448, RU449, RU450, RU451, RU465, RU466, RU467, RU468, RU469, RU471, RU472, RU473, RU453, RU85, RU188, RU88, RU89, RU90, RU094, RU219, RU217, RU218, RU220, RU221, RU223, RU224, RU225, RU292, RU238, RU243, RU9, RU86, RU87	<i>M. armipes</i> Црна Гора (Дурмитор, Орјен, Проклетије), Србија (Вршачке планине, Златибор, Голија, Фрушка гора), Хрватска (Крк, Црес, Истра), Словенија (Шмарје)	<i>M. armipes</i> Апенинско полуострво и Средња Европа
		<i>M. armipes</i> Италија (Трентино) и Немачка	
		<i>M. armipes</i> Турска (Болу, Илгаз)	<i>M. armipes</i> Анадолија
Ген8	RU41, RU42, RU43, RUT1, RUT2, RUT3, RUT4, RUT5, RU254, RU255, RU274, RU44, RU318	<i>M. trebevicensis</i> Србија (Дубашница, Голија) и Грчка (Олимп, Фалакро)	<i>M. trebevicensis</i> Балкан
		<i>M. trebevicensis</i> Украјина (Крим)	<i>M. trebevicensis</i> Украјина
Ген9	RU45, RU46, RU47, RU48, RU49, RU50, RU51, RU52, RU53, RU54	<i>M. trebevicensis</i> Турска (Рахат)	<i>M. trebevicensis</i> Анадолија
Ген10	RU65, RU66, RU68, RU60, RU61, RU62, RU63, RU64	<i>M. auripes</i> Грчка (Маинало)	<i>M. auripes</i> Балкан — Пелопонез
Ген11	RU58, RU67, RU69	<i>M. auripes</i> Грчка (Драма, Пиндос)	<i>M. auripes</i> Балкан и Украјина — Запорошка област
Ген12	RU59, RU56, RU57, RU323, RU324, RU55, RU279, RU280, RU283, RU284, RU290, RU421, RU422, RU286, RU287, AU1828	<i>M. auripes</i> Грчка (Драма), Црна Гора (Дурмитор, Маглић, Ловћен), и Србија (Мироч, Ђердап)	
		<i>M. auripes</i> Украјина (Запорошка област)	
Ген13	RU70, RU71, RU447, RU452	<i>M. auripes</i> Турска (Баликесир, Болу)	<i>M. auripes</i> Анадолија
Ген14	AU1833, AU1834, RU276, RU210, RU424, RU425	<i>M. ruficornis</i> Србија (Власина, Копаоник, Фрушка гора), Црна Гора (Дурмитор)	<i>M. ruficornis</i> Балкан
Ген15	AU1837, AU1836	<i>M. ruficornis</i> Украјина (Иваново-Франковска област)	<i>M. ruficornis</i> Украјина
Ген16	AU1821, AU1822	<i>M. ruficornis</i> Француска (Тенде)	<i>M. ruficornis</i> Западна Европа
Ген17	RU312, RU314, AU1831, AU1830	<i>M. portschinskyi</i> Грузија (Имеретија)	<i>M. portschinskyi</i>
Ген18	RU185, RU186, RU187, RU351, AU1847, AU1846, AU1848	<i>M. hoplitis</i> Црна Гора (Орјен, Ловћен)	<i>M. hoplitis</i>
Ген19	RU182, RU183, RU184, RU398, RU432, RU433, RU435, RU436, RU440, RU442, RU443, RU445, RU446	<i>M. papillus</i> Грчка (Лезбос)	<i>M. papillus</i> Егејски архипелаг — Лезбос
		<i>M. ovaloides</i> Турска (Илгаз)	<i>M. ovaloides</i>
Ген20	RU189, RU190	<i>M. fulvitaris</i> Иран	<i>M. fulvitaris</i>
Ген21	RU201, RU202	<i>M. acutus</i> Русија (Кавказ)	<i>M. acutus</i>
Ген22	AU1820	<i>M. gallicus</i> Француска (Тенде)	<i>M. gallicus</i>

Табела 14. Основни параметри генетичког диверзитета *Merodon ruficornis* групе врста засновани на секвенцама једарног *ITS2* региона.

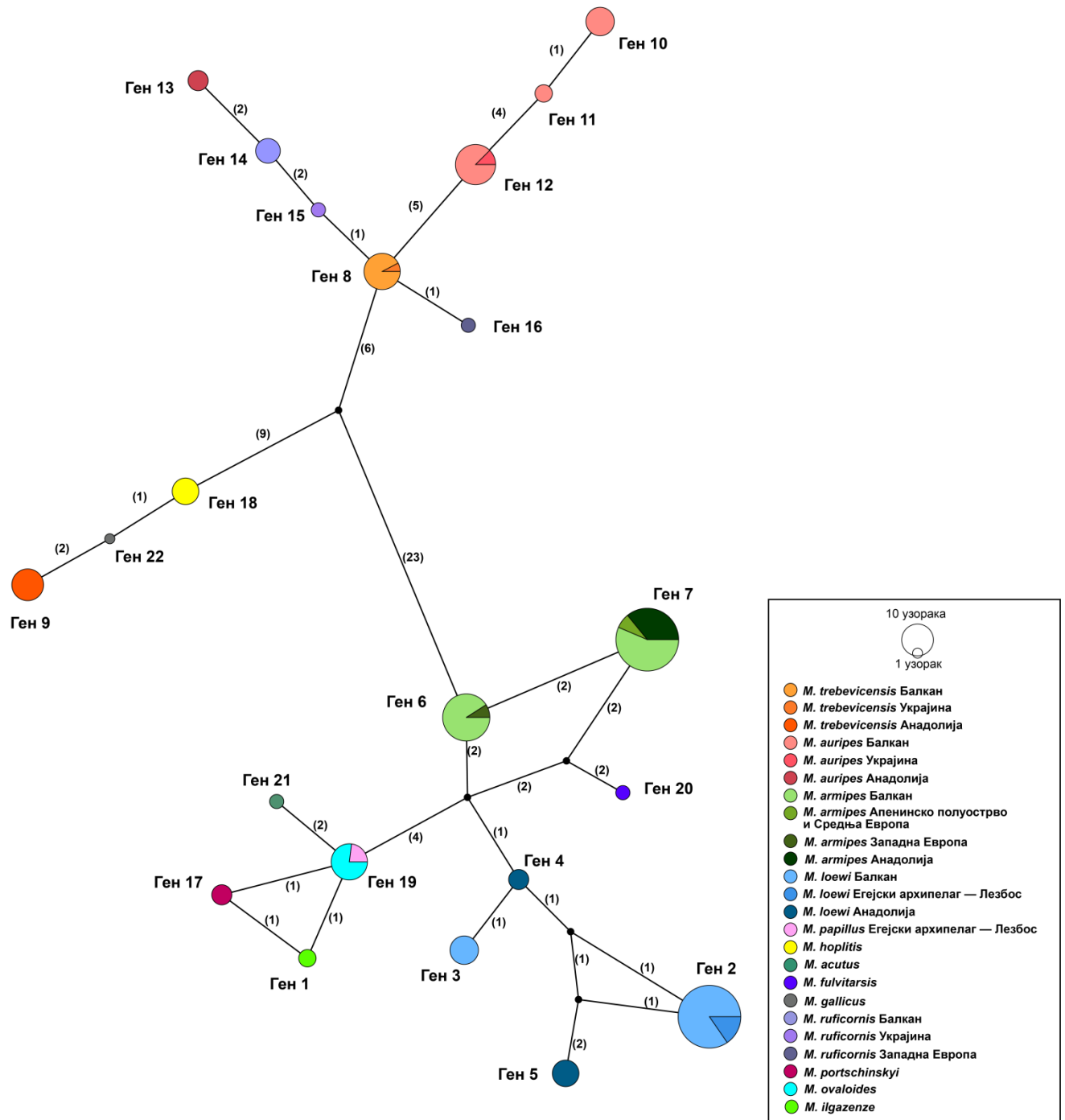
	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>g</i>	<i>Gd</i>	<i>K</i>	π
1. <i>M. trebevicensis</i>	23	1	2	0,514	0,514	0,00152
2. <i>M. auripes</i>	31	1	2	0,490	0,490	0,00144
3. <i>M. hoplitis</i>	7	0	1	0	0	0
4. <i>M. acutus</i>	2	0	1	0	0	0
5. <i>M. papillus</i>	4	0	1	0	0	0
6. <i>M. armipes</i>	62	0	1	0	0	0
7. <i>M. loewi</i>	58	3	4	0,518	1,075	0,00335
8. <i>M. fulvitaris</i>	2	0	1	0	0	0
9. <i>M. ovaloides</i>	9	0	1	0	0	0
10. <i>M. ilgazenze</i>	3	0	1	0	0	0
11. <i>M. ruficornis</i>	10	2	2	0,356	0,711	0,00210
12. <i>M. portschinskyi</i>	4	0	1	0	0	0
13. <i>M. gallicus</i>	1	0	1	0	0	0
<i>M. ruficornis</i> група	216	7	9	0,681	1,182	0,0038

N - број секвенци ; *S* - број полиморфних позиција; *g* - број генотипова; *Gd* - диверзитет генотипова; *K* - просечан број нуклеотидних разлика; π - диверзитет нуклеотида.

Табела 15. Основни параметри генетичког диверзитета *Merodon ruficornis* групе врста засновани на варијабилности насталој услед инсерција и делеција унутар секвенце једарног *ITS2* региона.

	<i>N</i>	<i>I</i>	<i>g(i)</i>	<i>Gd(i)</i>	<i>K(i)</i>	$\pi(i)$
1. <i>M. trebevicensis</i>	23	3	2	0.514	1.542	0.00433
2. <i>M. auripes</i>	31	3	3	0.611	0.981	0.00280
3. <i>M. hoplitis</i>	7	0	1	0	0	0
4. <i>M. acutus</i>	2	0	1	0	0	0
5. <i>M. papillus</i>	4	0	1	0	0	0
6. <i>M. armipes</i>	62	1	2	0.474	0.474	0.00147
7. <i>M. loewi</i>	58	1	2	0.216	0.216	0.00067
8. <i>M. fulvitaris</i>	2	0	1	0	0	0
9. <i>M. ovaloides</i>	9	0	1	0	0	0
10. <i>M. ilgazenze</i>	3	0	1	0	0	0
11. <i>M. ruficornis</i>	10	1	2	0.533	0.533	0.00156
12. <i>M. portschinskyi</i>	4	0	1	0	0	0
13. <i>M. gallicus</i>	1	0	1	0	0	0
<i>M. ruficornis</i> група	216	12	14	0,876	3,551	0,00962

N – број секвенци; *I* – број индела; *g(i)* – број генотипова; *Gd(i)* – диверзитет генотипова; *K(i)* – просечан број разлика заснованих на инделима; $\pi(i)$ – диверзитет индела по појединачној позицији унутар секвенце.



Слика 7. Median-joining мрежа ITS2 генотипова *Merodon ruficornis* групе врста.

5.2. Кластер анализе и процена филогенетских односа унутар *Merodon ruficornis* групе врста

Стабла конструисана на основу матрице комбинованих секвенци 3' и 5' фрагмента митохондријског *COI* гена, применом метода највеће вероватноће (*ML*) и Бајесовог закључивања, указала су на сложене односе између испитиваних врста као и на генетичку дивергенцију популација са Балканског и Анадолијског полуострва код *M. auripes*, *M. armipes* и *M. trebevicensis*, али не и унутар *M. loewi* (Слика 8, Слика 9). Диференцијација је такође уочена и између балканских и западноевропских узорака у оквиру врсте *M. ruficornis*. Међутим, без обзира на јасне морфолошке карактере, секвенце *COI* гена нису успеле да разграниче врсте *M. armipes*, *M. loewi* и *M. papillus*, при чему су *M. armipes* и *M. trebevicensis* представљене као полифилетске. Наиме, јединке *M. armipes* пореклом са Балканског и Анадолијског полуострва су груписане заједно са врстама *M. loewi* и *M. papillus*, док је за *M. armipes* из Западне и Централне Европе и са Апенинског полуострва показано да се групише заједно са представницима врсте *M. trebevicensis*. Са друге стране, узорци *M. trebevicensis* из Украјине и са појединих балканских локалитета (Голија, Проклетије, Фалакрон и Олимп) су показали припадност различитој клади у односу на јединке исте врсте које су сакупљене на балканској планини Дубашници и Анадолијском полуострву. Поред тога, монофилија на основу мтДНК није забележена ни код врста *M. auripes* и *M. loewi*. Тако су имплементацијом Бајесововог закључивања у анализи секвенци *COI* гена (Слика 8), уочени наредни таксономски односи: ((*M. gallicus*)+(*M. ruficornis* Балкан и Украјина+(*M. ruficornis* Западна Европа)))+(((*M. portschinskyi*)+(((*M. hoplitis*)+((*M. trebevicensis* Украјина и Балкан — Голија, Проклетије, Фалакро, Олимп)+(*M. trispinus*)))))+(((*M. armipes* Апенинско полуострво)+(*M. trebevicensis* Балкан — Дубашница)))+(*M. armipes* Западна и Средња Европа)+(*M. trebevicensis* Анадолија)))+(((*M. acutus*)+(*M. ovaloides*)+((*M. ilgazenze*)+(*M. auripes* Анадолија и Украјина — Запорошка област)))+(*M. auripes* Балкан и Украјина — Одешка област)+(((*M. lamellatus*)+(*M. papillus* Анадолија и Егејски архипелаг — Лезбос + *M. loewi* Анадолија — Црноморска регија + *M. armipes* Анадолија — Црноморска регија +(*M. loewi* Егејски архипелаг — Лезбос)+(*M. armipes* Анадолија — Црноморска регија)))+((*M. fulvitaris*)+(*M. loewi* Анадолија — Егејска регија)+(*M. loewi* Балкан, Украјина и Анадолија — Средоземна регија + *M. armipes* Балкан и Украјина)))))))); док се топологија *ML* стабла незнатно разликује (Слика 8).

Анализом комбинованих секвенци 3' и 5' фрагмента митохондријског *COI* гена откривено је да се некориговане вредности дистанци (p - *uncorrected pairwise distance*) између парова врста *M. ruficornis* групе крећу од 0,09% до 5,41%, са просечном вредношћу од 2,77% (Табела 16). Сличан образац уочен је и испитивањем секвенци 5' фрагмента *COI* гена, односно такозваног ДНК баркода, на основу ког су установљене стопе удаљености у распону од 0,16% до 5,22% (Табела 17).

Просечне вредности некориговане генетичке дистанце су израчунате и између популација врста *M. armipes*, *M. loewi*, *M. trebevicensis* и *M. auripes* и осталих анализираних врста. Сумирањем резултата добијених анализом комбинованих секвенци оба фрагмента *COI* гена откривено је да се вредности некоригованих дистанци између популација *M. armipes* врсте крећу у опсегу од 0,93% до 2,57%, затим од 0,07% до 1,15% унутар *M. loewi*, као и у распону од 0,97% до 3,07% у оквиру врсте *M. trebevicensis*, док је дистанца од 1,44% забележена између балканске и анадолијске популације *M. auripes* (Табела П4). Сличне вредности опсега некоригованих дистанци уочени су применом анализе секвенци ДНК баркод региона (Табела П5).

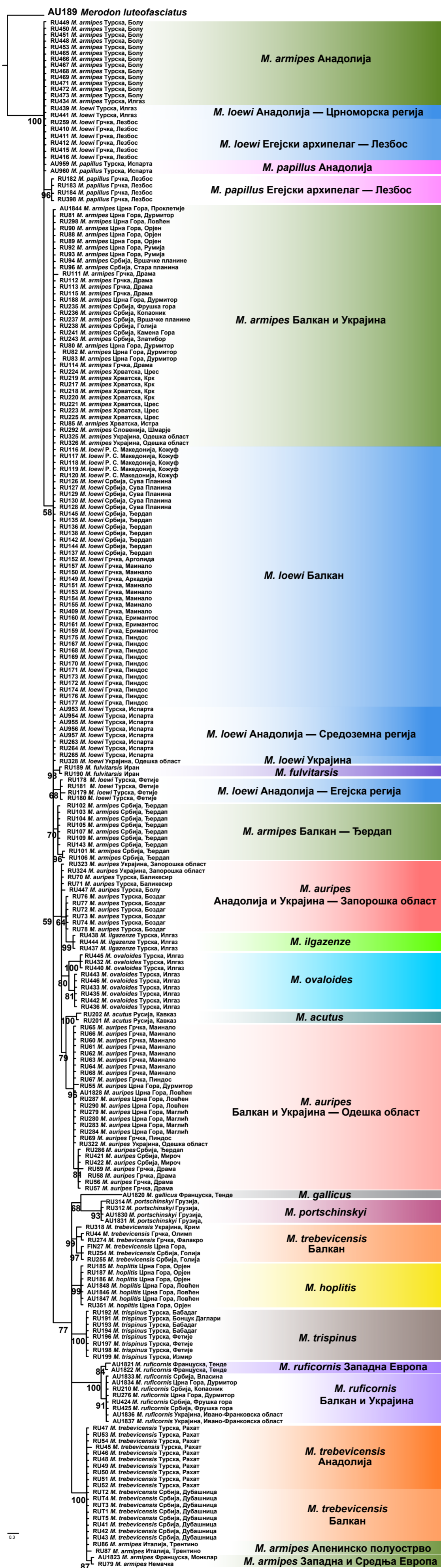
Табела 16. Приказ просечних вредности некориговане генетичке дистанце (p - *uncorrected pairwise distance*) заснованих на комбинованим секвенцама 3' и 5' фрагмента *COI* гена између парова врста *Merodon ruficornis* групе.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. <i>M. trebevicensis</i>														
2. <i>M. auripes</i>	0,0268													
3. <i>M. armipes</i>	0,0276	0,017												
4. <i>M. loewi</i>	0,0285	0,0163	0,0054											
5. <i>M. hoplitis</i>	0,0243	0,028	0,029	0,0292										
6. <i>M. trispinus</i>	0,0284	0,032	0,0333	0,0333	0,0244									
7. <i>M. papillus</i>	0,0263	0,0147	0,0077	0,0071	0,0288	0,0332								
8. <i>M. fulvitaris</i>	0,0275	0,0153	0,0086	0,0073	0,0294	0,0322	0,0067							
9. <i>M. acutus</i>	0,0262	0,015	0,0133	0,0124	0,026	0,0318	0,0107	0,0128						
10. <i>M. gallicus</i>	0,0502	0,0515	0,0537	0,0542	0,0476	0,0486	0,0528	0,0541	0,0501					
11. <i>M. ruficornis</i>	0,0384	0,0373	0,0404	0,0406	0,0379	0,042	0,0392	0,0383	0,0409	0,0493				
12. <i>M. portschinskyi</i>	0,0328	0,0327	0,0357	0,0359	0,0351	0,038	0,0345	0,0336	0,0347	0,0519	0,0363			
13. <i>M. lamellatus</i>	0,026	0,0139	0,0072	0,0064	0,028	0,0323	0,0009	0,0058	0,0099	0,0519	0,0383	0,0336		
14. <i>M. ovaloides</i>	0,03	0,0161	0,0169	0,0163	0,0309	0,0356	0,0151	0,0158	0,0149	0,0519	0,039	0,0348	0,0143	
15. <i>M. ilgazenze</i>	0,0257	0,0148	0,0166	0,0163	0,0289	0,0319	0,0155	0,0161	0,0152	0,05	0,0349	0,0317	0,0146	0,0182

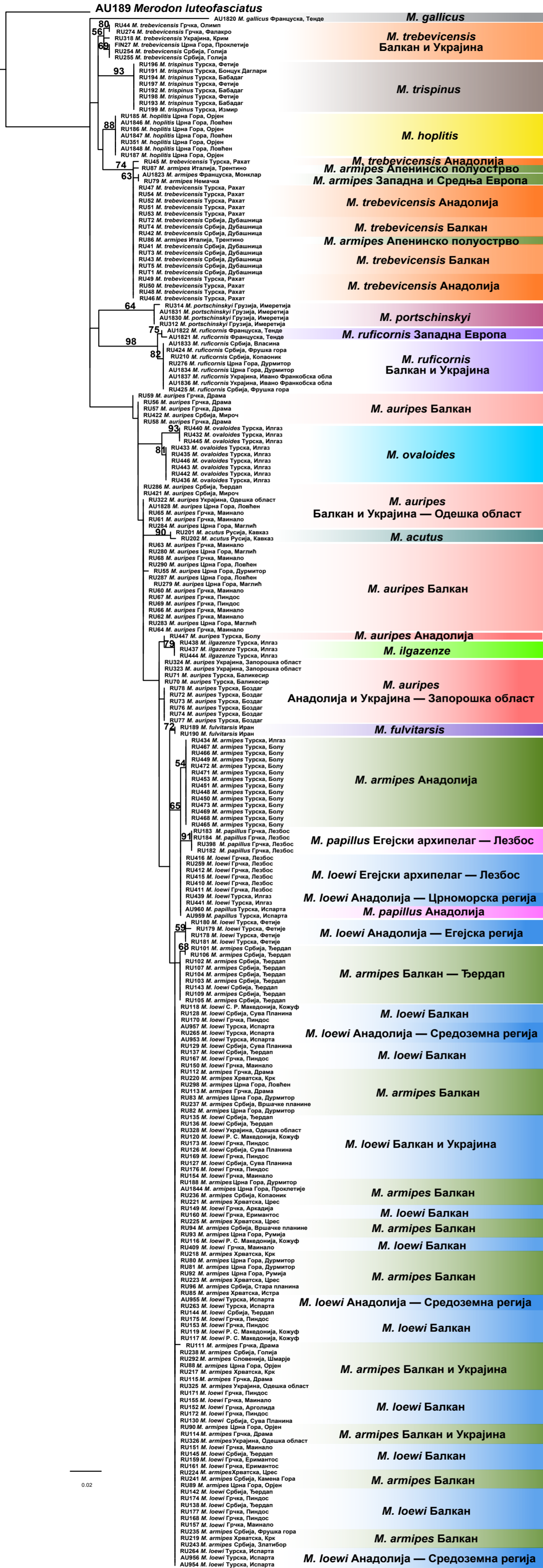
Табела 17. Приказ вредности некоригованих просечних генетичких дистанци (p - *uncorrected pairwise distance*) заснованих на секвенцама 5' фрагмента митохондријског *COI* гена између парова врста *Merodon ruficornis* групе.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. <i>M. trebevicensis</i>														
2. <i>M. auripes</i>	0,0228													
3. <i>M. armipes</i>	0,0297	0,0155												
4. <i>M. loewi</i>	0,0309	0,0151	0,0052											
5. <i>M. hoplitis</i>	0,025	0,025	0,0298	0,0305										
6. <i>M. trispinus</i>	0,0281	0,026	0,0283	0,0283	0,0218									
7. <i>M. papillus</i>	0,0313	0,0162	0,0081	0,0076	0,0343	0,0322								
8. <i>M. fulvitaris</i>	0,0306	0,0145	0,0085	0,0073	0,0326	0,0306	0,0082							
9. <i>M. acutus</i>	0,0288	0,0154	0,0185	0,0177	0,0269	0,0277	0,0188	0,0204						
10. <i>M. gallicus</i>	0,0491	0,0425	0,049	0,0492	0,0475	0,0498	0,0506	0,0506	0,0432					
11. <i>M. ruficornis</i>	0,0331	0,0263	0,0313	0,032	0,0335	0,0354	0,033	0,0313	0,0354	0,0476				
12. <i>M. portschinskyi</i>	0,0352	0,0308	0,0389	0,0395	0,0354	0,0367	0,0408	0,0392	0,04	0,0522	0,0284			
13. <i>M. lamellatus</i>	0,0306	0,0146	0,0071	0,0064	0,0326	0,0306	0,0016	0,0065	0,0171	0,0489	0,0313	0,0392		
14. <i>M. ovaloides</i>	0,0305	0,0139	0,0198	0,0191	0,0312	0,0324	0,0212	0,0196	0,0193	0,0464	0,0313	0,0359	0,0196	
15. <i>M. ilgazenze</i>	0,0257	0,0087	0,0169	0,0163	0,0288	0,0296	0,0174	0,0158	0,0166	0,0484	0,0308	0,0353	0,0158	0,0158

Испитивање секвенци митохондријског *Cyt b* гена применом *ML* и Бајесове анализе, такође није резултовало делинеацијом између свих испитиваних врста (Слике 10, 11). Поред тога, уочено је и одсуство монофилије у еволуцији овог гена код одређених врста. Стога су на основу варијабилности испитиваних митохондријских гена, остала неразјашњена таксономска питања између врста *M. armipes*, *M. loewi* и *M. papillus*, као и између јединки *M. armipes* и *M. trebevicensis* врста. Додатно је на основу топологије *Cyt b* генских стабала забележено раздвајање између балканских и турских узорака у оквиру *M. armipes* и *M. auripes*, што није био случај за јединке врста *M. loewi* и *M. trebevicensis*. Применом методе највеће вероватноће су у односу на методу Бајесовог закључивања, уочене одређене разлике у топологији *Cyt b* стабла, претежно засноване на формирању кластера са ниском статистичком подршком (Слика 10, 11).

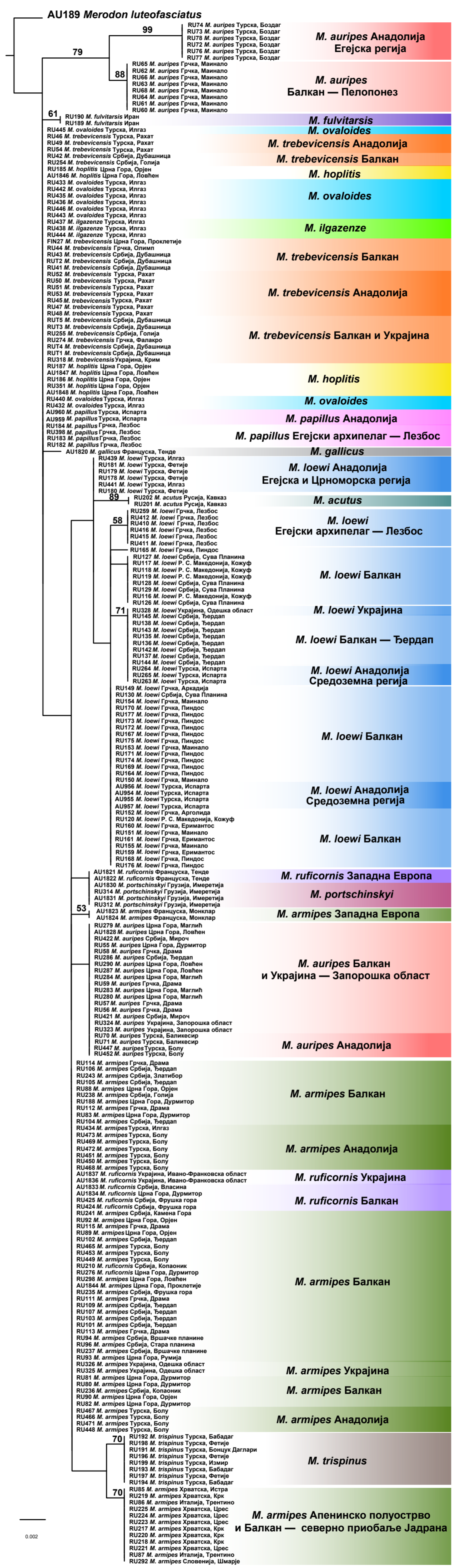
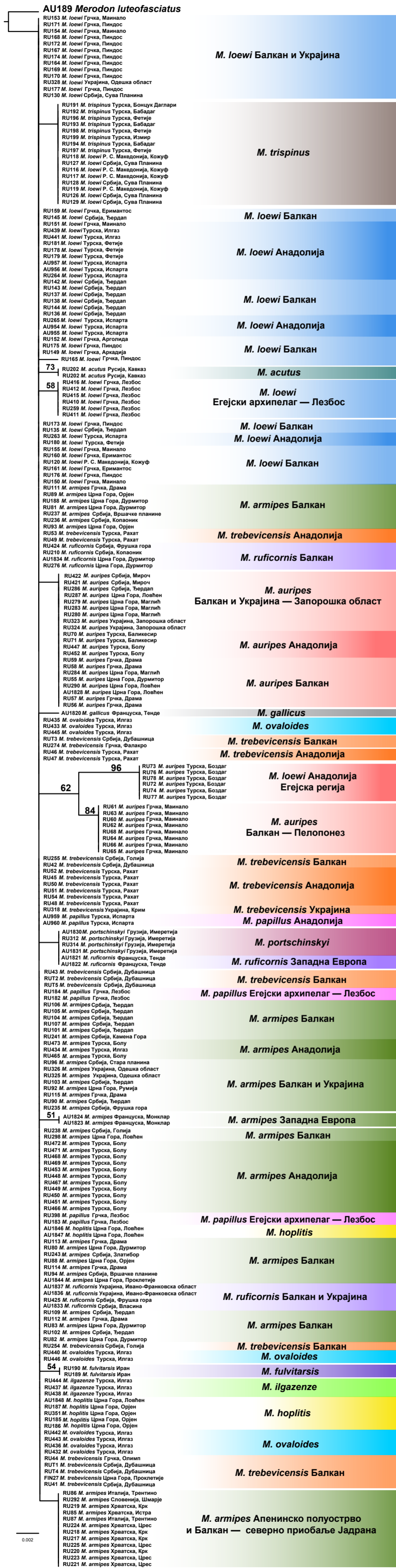


Слика 10. Бајесово стабло *Merodon ruficornis* групе врста засновано на секвенцама митохондријског *Cyt b* gena. Вредности постериорне вероватноће су приказане поред чворова.

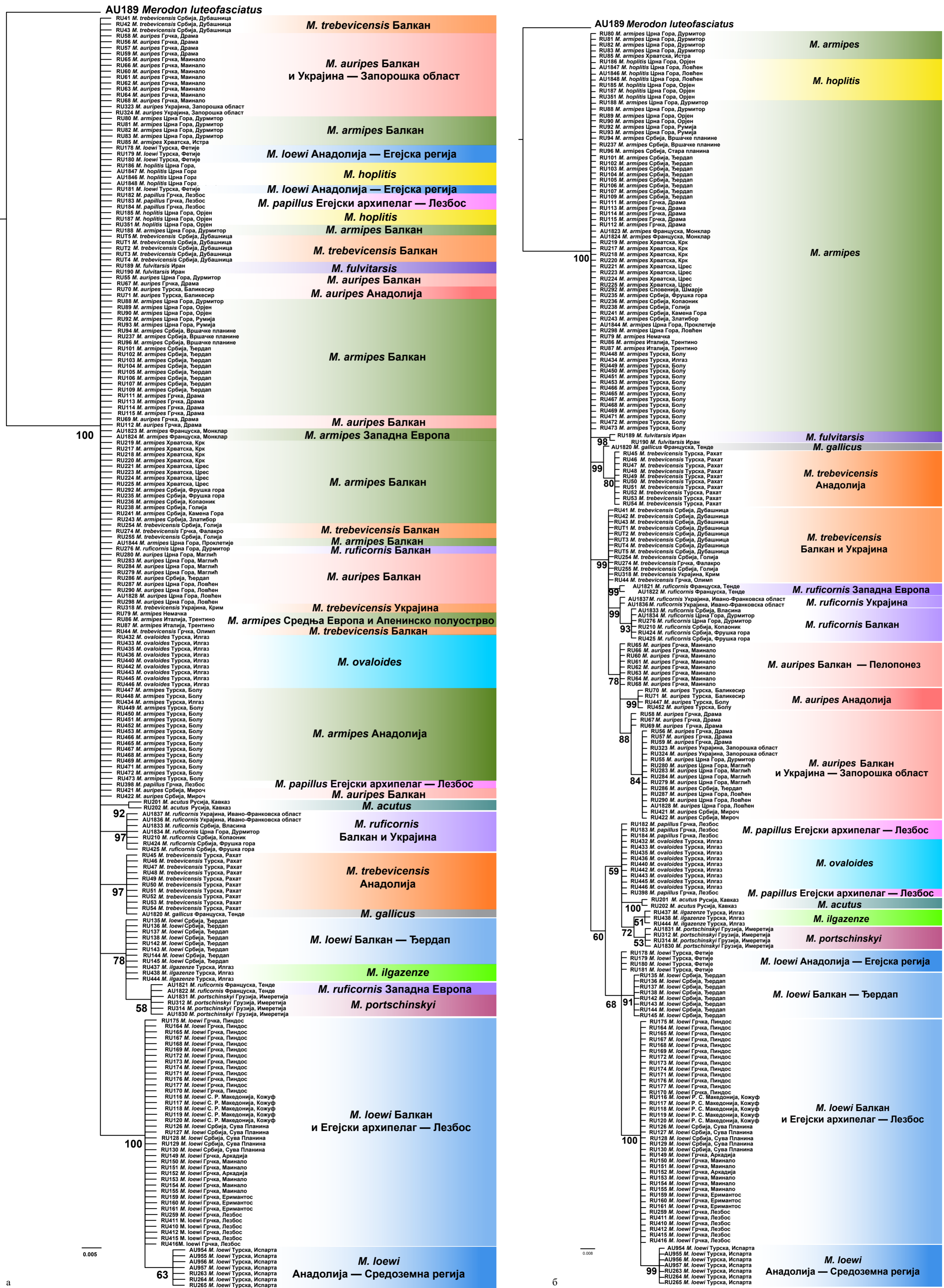


Слика 11. Стабло највеће вероватноће (енгл. *Maximum Likelihood*) *Merodon ruficornis* групе врста засновано на секвенцама митохондријског *Cyt b* гена. *Bootstrap* вредности статистичке подршке клади су приказане поред чворова.

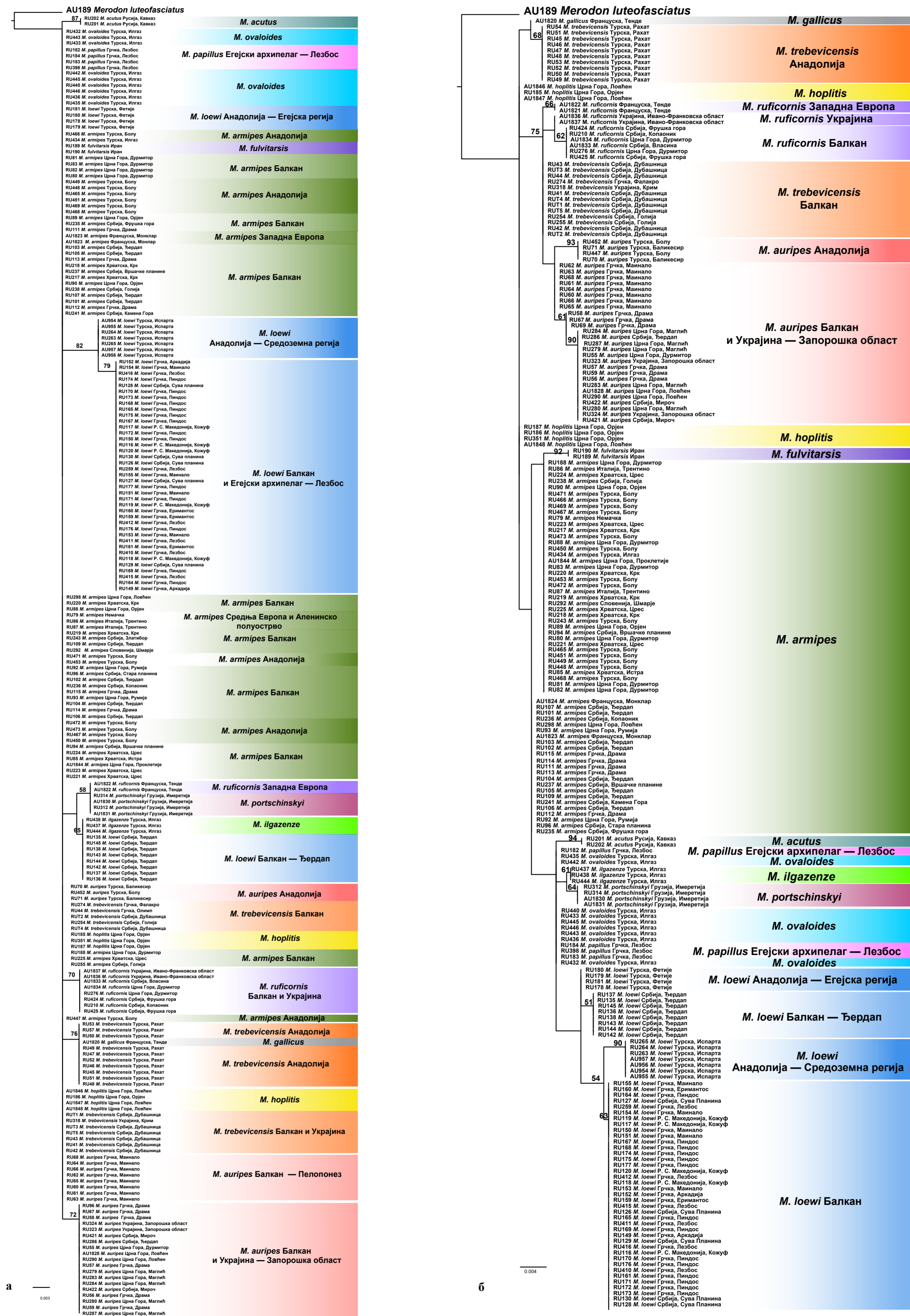
Како би се проценио значај филогенетског сигнала насталог деловањем инсерција и делеција, нуклеотидне празнине унутар одабраних једарних маркера су посматране на два различита начина, односно као непостојећи подаци или у виду бинарних читања која се односе на присуство/одсуство одређене празнине у секвенци. Према томе, секвенце једарних 28S рРНК гена и *ITS2* региона су, са или без бинарно представљених индела, одвојено испитиване применом кластер анализа највеће вероватноће и Бајесовог закључивања. Сагледавањем добијених резултата је за оба генетичка региона утврђено да показују вишу резолуциону моћ уколико су поред нуклеотидних секвенци испитивани и бинарно кодирани индели (Слике 12, 13, 14, 15). Према томе, секвенце *ITS2* региона са бинарним читањима индела су омогућиле идентификацију и успешно разграничавање свих таксона, изузев *M. ovaloides* и *M. papillus*, за које је показано да деле заједнички генотип (Слике 14б, 15б). Поред тога, резултати *ML* кластер анализе указали су на ниску подржаност у раздвајању *M. armipes* and *M. hoplitis* (Слика 15б), док су на Бајесовом стаблу ове две врсте кластероване заједно (Слика 14б). Важно је напоменути да резултати испитивања једарних маркера, за разлику од митохондријских, нису указали на полифилију у молекуларној еволуцији врсте *M. armipes*, као ни груписање балканских *M. trebevicensis* узорака у различите кладе.



Слика 13. Стабло највеће вероватноће (енгл. *Maximum Likelihood*) *Merodon ruficornis* групе врста на секвенцама 28S рНК гена, са вредностима *bootstrap* статистичке подршке приказаним поред чворова. а) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце без индела. б) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце заједно са бинарно читаним инделима.



Слика 14. Бајесово стабло *Merodon ruficornis* групе врста засновано на секвенцама *ITS2* региона, са вредностима постериорне вероватноће приказаним поред чворова. а) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце без индела. б) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце заједно са бинарно читаним инделима.

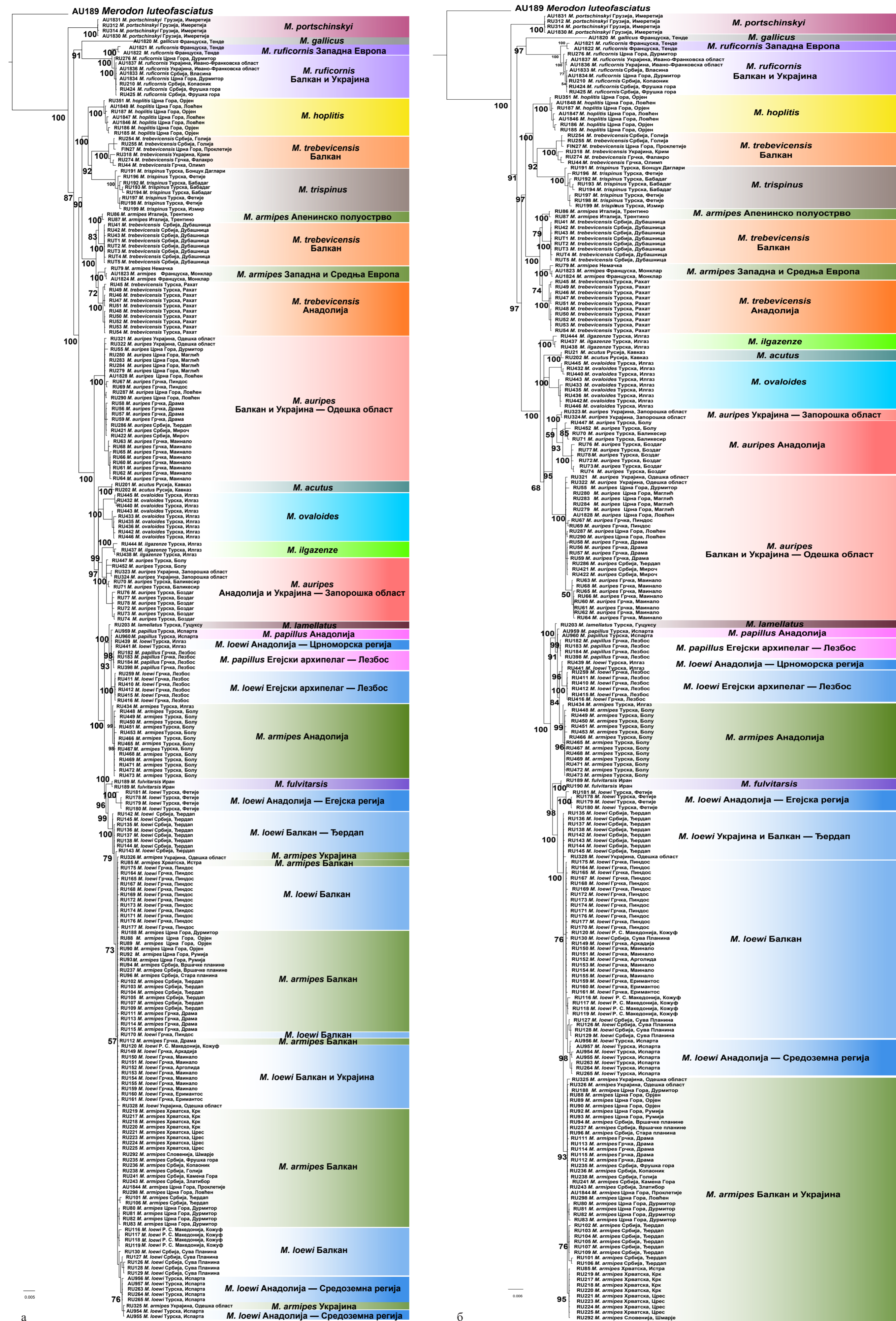


Слика 15. Стабло највеће вероватноће (енгл. Maximum Likelihood) *Merodon ruficornis* групе врста на секвенцама *ITS2* региона, са вредностима *bootstrap* статистичке подршке приказаним поред чворова. а) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце без индела. б) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце заједно са бинарно читаним индेलима.

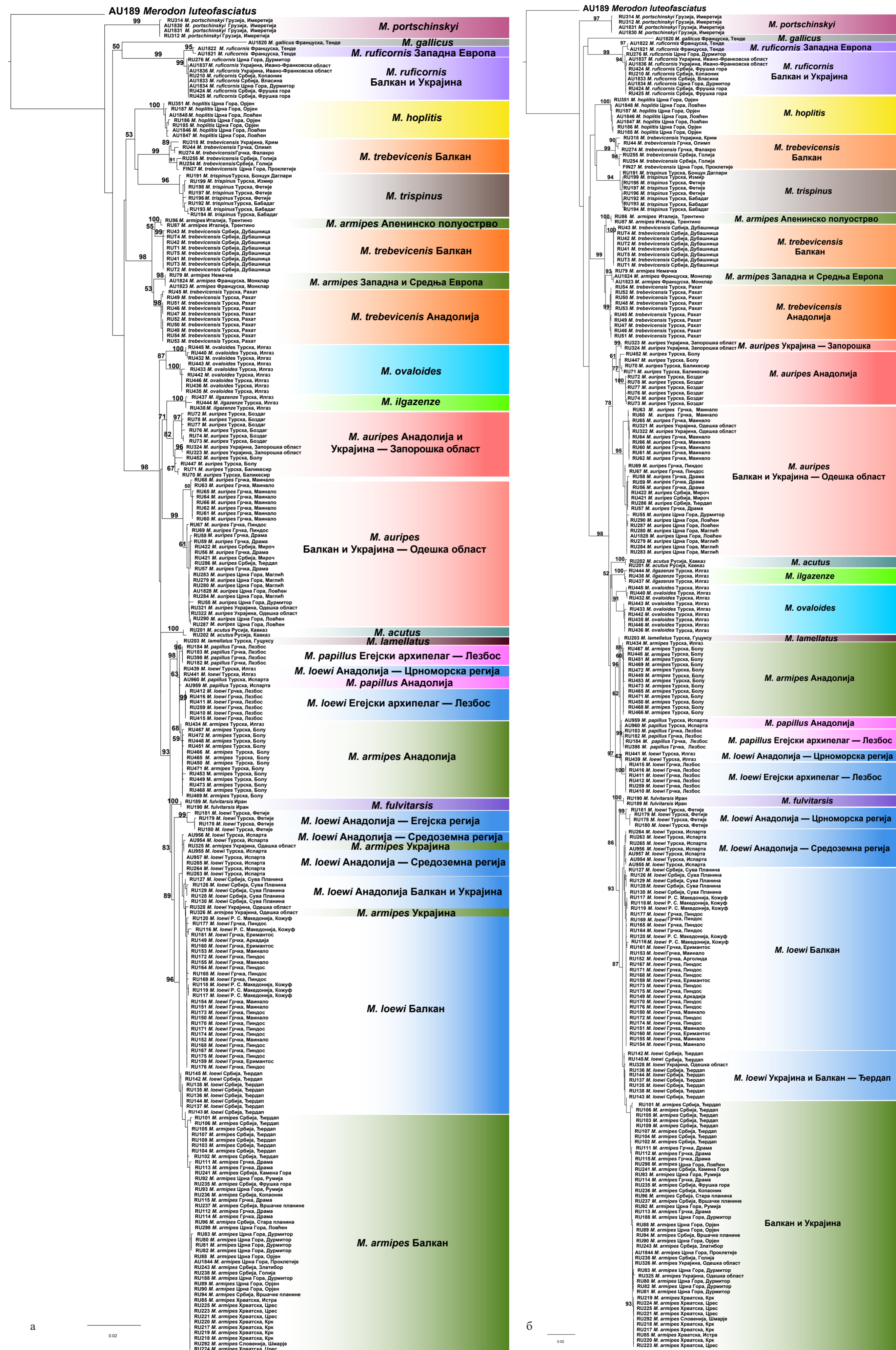
Добијена филогенетска стабла конструисана на основу секвенци комбинованих митохондријских и једарних региона без кодираних индела (3' и 5' фрагменти *COI* гена, *Cyt b* ген, 28S рРНК ген и *ITS2* регион) нису пружила јасну слику филогенетских односа између таксона *M. ruficornis* групе (Слике 16а, 17а). Поред учесталости полифилетске и парафилетске еволуције, забележена је неуспешност у раздвајању врста *M. loewi* и *M. papillus*, односно *M. loewi* и *M. armipes*, за које је претходно показано да деле заједничке секвенце испитиваних митохондријских гена. Сагледавањем топологије конструисаних стабала, процењени су следећи филогенетски односи (Бајесово стабло): (*M. portschinskyi*)+(((*M. gallicus*)+(*M. ruficornis* Западна Европа)+(*M. ruficornis* Балкан и Украјина)))+(((*M. hoplitis*)+(*M. trebevicensis* Украјина и Балкан — Голија, Проклетије, Фалакро, Олимп)+(*M. trispinus*)))+(((*M. armipes* Апенинско полуострво)+(*M. trebevicensis* Балкан — Дубашница))+(*M. armipes* Западна и Средња Европа)+(*M. trebevicensis* Анадолија)))+((*M. auripes* Балкан и Украјина — Одешка област)+((*M. acutus*)+(*M. ovaloides*)+(*M. ilgazenze*)+(*M. auripes* Анадолија и Украјина — Запорошка област)))+(((*M. lamellatus*)+(*M. papillus* Анадолија + *M. loewi* Анадолија — Црноморска регија)+(*M. papillus* Егејски архипелаг — Лезбос)+(*M. loewi* Егејски архипелаг — Лезбос)+(*M. armipes* Анадолија — Црноморска регија)))+((*M. fulvitaris*)+((*M. loewi* Анадолија — Егејска регија)+(*M. loewi* Балкан, Украјина и Анадолија — Средоземна регија + *M. armipes* Балкан и Украјина)))))))).

Насупрот томе, анализа комбинованих секвенци митохондријских и једарних маркера са интегрисаним подацима добијеним на основу бинарно кодираних индела, допринела је разграничењу између свих испитиваних таксона, укључујући врсте *M. loewi*, *M. papillus* и *M. armipes* (Слике 16б, 17б), указавши притом на следеће филогенетске односе (Бајесово стабло): (*M. portschinskyi*)+(((*M. gallicus*)+(*M. ruficornis* Западна Европа)+(*M. ruficornis* Балкан и Украјина)))+(((*M. hoplitis*)+(*M. trebevicensis* Украјина и Балкан — Голија, Проклетије, Фалакро, Олимп)+(*M. trispinus*)))+(((*M. armipes* Апенинско полуострво)+(*M. trebevicensis* Балкан — Дубашница))+(*M. armipes* Западна и Средња Европа)+(*M. trebevicensis* Анадолија)))+((*M. ilgazenze*)+((*M. acutus*)+(*M. ovaloides*)+(((*M. auripes* Украјина — Запорошка област)+(*M. auripes* Анадолија))+(*M. auripes* Балкан и Украјина — Одешка област)))+(((*M. lamellatus*)+(*M. papillus* Анадолија +(*M. papillus* Егејски архипелаг — Лезбос))+(*M. loewi* Анадолија — Црноморска регија +(*M. loewi* Егејски архипелаг — Лезбос))+(*M. armipes* Анадолија — Црноморска регија)))+((*M. fulvitaris*)+((*M. loewi* Анадолија — Егејска регија)+(*M.*

loewi Балкан, Украјина и Анадолија — Средоземна регија +(M. *armipes* Балкан и Украјина)))))). Међутим, за разлику од Бајесовог закључивања (Слика 16б), стабло највеће вероватноће није пружило статистичку подршку клади која у односу на *M. loewi*, одваја балканске и украјинске представнике врсте *M. armipes*, док је ниска *bootstrap* подржаност на *ML* стаблу, забележена је за кладу која одговара врсти *M. loewi* са острва Лезбос и турске планине Илгаз (Слика 14б).



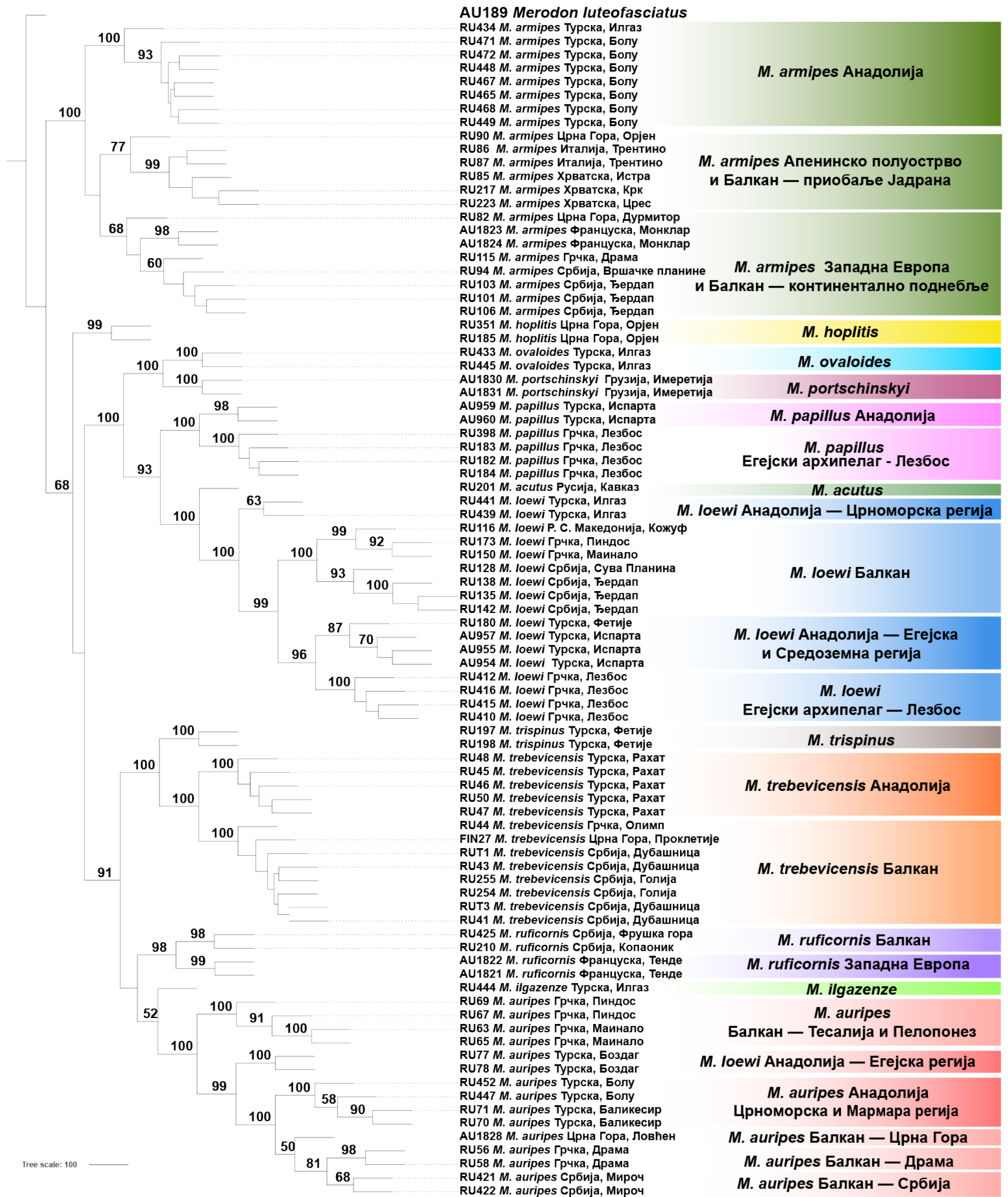
Слика 16. Филогенетско Бајесово стабло *Merodon ruficornis* групе врста засновано на секвенцама комбинованих митохондријских и једарних маркера (3 и 5' фрагменти *COI* гена, *Cyt b* ген, 28S рРНК ген и *ITS2* регион), са вредностима постериорне вероватноће приказаним поред чворова. а) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце без индела. б) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце заједно са бинарно читаним инделима унутар испитиваних једарних маркера.



Слика 17. Филогенетско стабло највеће вероватноће (енгл. Maximum Likelihood) *Merodon ruficornis* групе врста засновано на секвенцама комбинованих митохондријских и једарних маркера (3 и 5' фрагменти *COI* гена, *Cyt b* ген, *28S* рРНК ген и *ITS2* регион), са вредностима bootstrap статистичке подршке приказаним поред чворова. а) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце без индела. б) Стабло конструисано на основу варијабилности нуклеотидне секвенце заједно са бинарно читаним инделима унутар испитиваних једарних маркера

Процени еволуционих односа унутар *M. ruficornis* групе је приступљено и са аспекта филогентских сигнала који су добијени испитивањем генетичких региона дистрибуираних широм генома. Филогенетско стабло највеће вероватноће које је конструисано на основу геномских података добијених *ddRAD-seq* приступом, коначно је пружило јасну филогенетску слику и омогућило успешно раздвајање и идентификацију свих испитиваних таксона. Наиме, резултати *ML* анализе указали су на монофилетско порекло врста из *M. ruficornis* групе, али и открили присуство унутарспецијске структурираности која је представљена груписањем јединки пореклом са истог или блиског поднебља (Слика 18). Сагледавањем топологије конструисаног стабла су између испитиваних таксона откривени следећи филогенетски односи: ((*M. armipes* Анадолија)+((*M. armipes* Апенинско полуострво и Балкан – приобаље Јадранског мора)+(*M. armipes* Западна Европа и Балкан – континентално поднебље)))+(((*M. ruficornis* Западна Европа)+(*M. ruficornis* Балкан)))+(((*M. hoplitis*)+(((*M. ovaloides*)+(*M. portschinskyi*))+(((*M. papillus* Анадолија)+(*M. papillus* Егејски архипелаг – Лезбос))+((*M. acutus*)+((*M. loewi* Анадолија– Црноморска регија)+((*M. loewi* Балкан)+((*M. loewi* Анадолија –Егејска и Средоземна регија)+(*M. loewi* Егејски архипелаг – Лезбос)))))))+(((*M. trispinus*)+((*M. trebevicensis* Анадолија)+(*M. trebevicensis* Балкан)))+((*M. ilgazenze*)+((*M. auripes* Балкан – Тесалија и Пелопонез)+((*M. auripes* Анадолија – Егејска регија)+((*M. auripes* Балкан – Црна Гора и Србија)+((*M. auripes* Балкан – Драма)+(*M. auripes* Анадолија – Црноморска и Мармара регија)))))))).

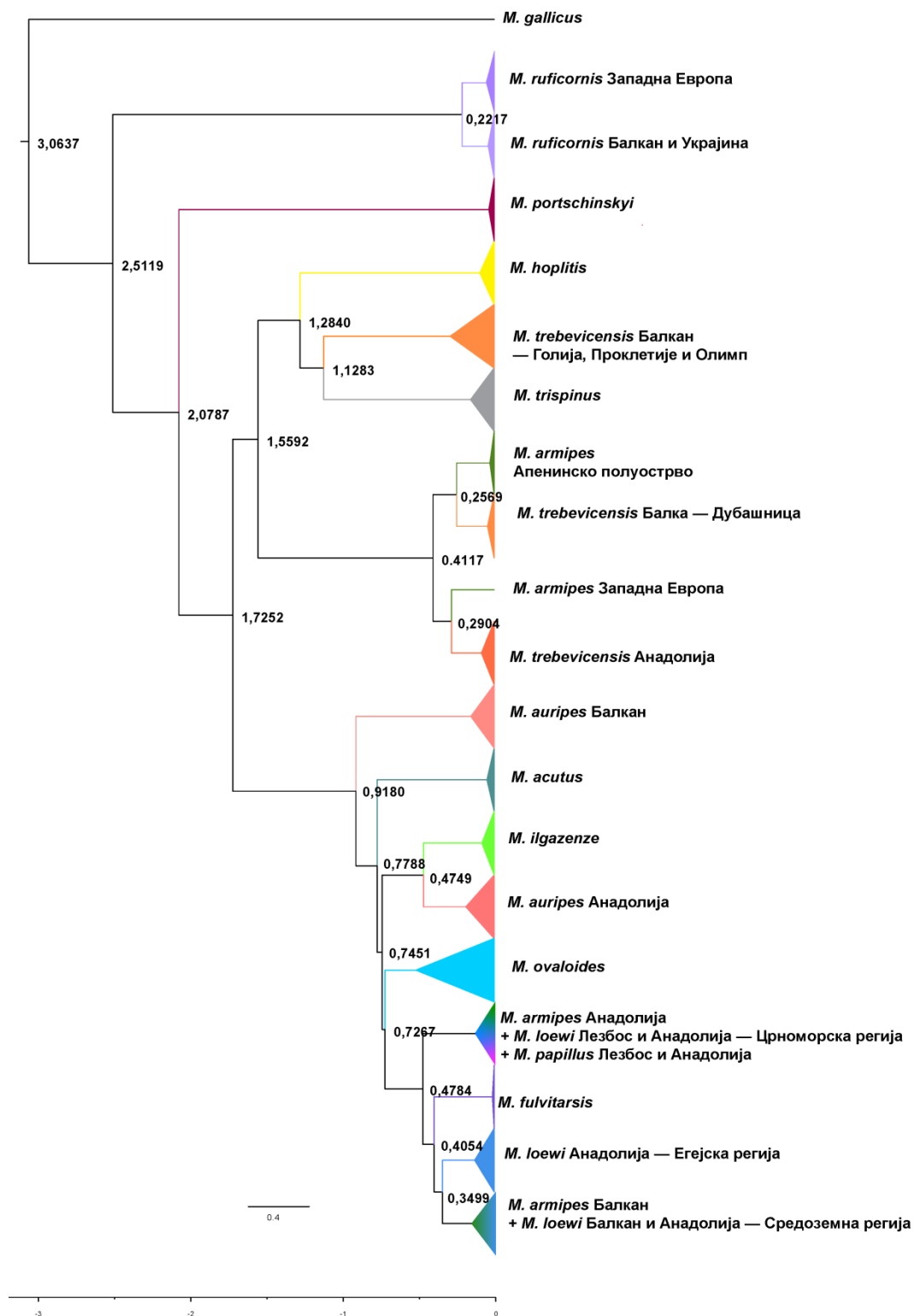
Геномски подаци добијени *ddRAD-seq* методом су, поред *ML* анализе филогеније, испитивани и методом коалесценције у циљу утврђивања стабла врста, као и упоредног приказа односа између таксона из *M. ruficornis* групе. Указавши на реципрочну монофилију свих испитиваних врста, стабло коалесценције је потврдило постојање јасних таксономских граница између врста унутар групе, као и присуство инстраспецијске диференцијације (Слика 19). Поред тога је проценом стабла коалесценције уочена разлика у односу на топологију *ML* филогенетског стабла, која се огледа у измењеном положају врсте *M. ruficornis* у филогенији групе. Са тим у вези, конструисано стабло врста је указало на следећу топологију: ((*M. armipes* Анадолија)+((*M. armipes* Апенинско полуострво и Балкан – приобаље Јадранског мора)+(*M. armipes* Западна Европа и Балкан – континентално поднебље)))+((*M. hoplitis*)+(((*M. ovaloides*)+(*M. portschinskyi*)))+((*M. papillus* Анадолија)+(*M. papillus* Егејски архипелаг – Лезбос)))+((*M. acutus*)+((*M. loewi* Анадолија – Црноморска регија)+((*M. loewi* Балкан)+((*M. loewi* Анадолија – Егејска и Средоземна регија)+(*M. loewi* Егејски архипелаг – Лезбос)))))))+((*M. trispinus*)+((*M. trebevicensis* Анадолија)+(*M. trebevicensis* Балкан)))+(((*M. ruficornis* Балкан)+(*M. ruficornis* Западна Европа)))+((*M. ilgazenze*)+((*M. auripes* Балкан – Тесалија и Пелопонез)+((*M. auripes* Анадолија – Егејска регија)+((*M. auripes* Анадолија – Црноморска и Мармара регија)+((*M. auripes* Балкан – Црна Гора)+((*M. auripes* Балкан – Драма)+(*M. auripes* Балкан – Србија)))))))))).



Слика 19. Стабло врста *Merodon ruficornis* групе засновано на коалесцентној анализи *ddRAD-seq* геномских података, са вредностима *bootstrap* статистичке подршке приказаним поред чворова.

5.3. Процена времена раздајања линија унутар *Merodon ruficornis* групе врста

Проценом времена дивергенције откривено је да се диверзификација линија унутар *M. ruficornis* групе врста претежно одиграла током Плеистоцена, при чему се на основу добијених резултата може уочити да је ова геолошка епоха имала улогу у раздвајању врста, али и диференцијацији између популација пореклом са различитих географски удаљених поднебља, поготово са Балканског и Анадолијског полуострва. (Слика 20). Наиме, према резултатима анализе је процењено да се раздвајање између линија које обухватају *M. trebevicensis* популацију са Анадолијског полуострва, односно балканске представнике исте врсте пореклом са планине Дубашница, одиграло оквирно пре 411 хиљада година. Резултати су додатно указали да је пре око 478 хиљада година дошло до издвајања *M. armipes* (Анадолија) + *M. loewi* (Егејски архипелаг — Лезбос и Анадолија — Црноморска регија) + *M. papillus*, у односу на линију која обухвата *M. fulvitarsis* + *M. loewi* (Анадолија — Егејска регија) + *M. armipes* (Балкан) + *M. loewi* (Балкан и Анадолија — Средоземна регија), док се анадолијска популације врсте *M. loewi* пореклом из Егејске регије одвојила пре отприлике 349 хиљада година. Поред тога је откривено да раздвајање француске популације *M. ruficornis* врсте од балканских и украјинских јединки датира из периода од пре 221 хиљаде година. Балканска популација врсте *M. auripes* се отприлике пре 918 хиљада година одвојила од линије која обухвата представнике *M. auripes* са Анадолијског полуострва + *M. acutus* + *M. ilgazenze* + *M. ovaloides* + *M. fulavitarsis* + *M. papillus* + *M. loewi* + *M. armipes*.



Слика 20. Хронограм диверзификације митохондријских линија унутар *Merodon ruficornis* групе врста конструисан применом програмског пакета BEAST. Просечна старост чворова је у милионима година процењена употребом *birth–death* модел настанка врста, док је као модел молекуларног сата узет *lognormal relaxed clock*.

5.4. Провера присуства унутарћелијског симбионта из рода *Wolbachia*

Присуство унутарћелијског симбионта из рода *Wolbachia* тестирано је код укупно 85 јединки из 11 различитих врста *M. ruficornis* групе осоликих мува, при чему је секвенца бактеријског 16S рРНК гена успешно продукована код 78 узорака. Укупна дужина анализираних матрице секвенци је након поравнања износила 331 bp. Тестирање је дало позитиван резултат и указало на инфекцију код свих испитиваних врста, изузев *M. hoplitis* (Табела 18). Поред тога, резултати анализе су открили да присуство *Wolbachia* не указује на повезаност са одређеним митохондријским хаплотипом, те да је инфекција забележена унутар свих испитиваних клада митохондријског *COI* гена, осим оне која представља врсту *M. hoplitis* (Слика 8). Међутим, анализом добијених секвенци откривено је да сви *Wolbachia* ендосимбионти пристуни код врста из *M. ruficornis* групе, деле идентичну секвенцу 16S хаплотипа, за који је на основу *BLAST* поређења са *NCBI* базом нуклеотидних секвенци, утврђено да припада *Wolbachia* супергрупи А, чије је присуство претходним испитивањима већ забележено код представника осоликих мува из *Merodon* рода.

Табела 18. Резултати тестирања на *Wolbachia* јединки припадника различитих врста *Merodon ruficornis* групе.

Лабораторијски код	Назив врсте	Локалитет	Географска област	16S
RU191	<i>Merodon trispinus</i>	Турска, Бонцук Даглари	Анадолија	+
RU196	<i>Merodon trispinus</i>	Турска, Фетије	Анадолија	+
RU223	<i>Merodon armipes</i>	Хрватска, Црес	Балкан	+
RU115	<i>Merodon armipes</i>	Грчка, Драма	Балкан	+
RU82	<i>Merodon armipes</i>	Црна Гора, Дурмитор	Балкан	+
RU90	<i>Merodon armipes</i>	Црна Гора, Орјен	Балкан	+
RU101	<i>Merodon armipes</i>	Србија, Ђердап	Балкан	+
RU103	<i>Merodon armipes</i>	Србија, Ђердап	Балкан	+
RU106	<i>Merodon armipes</i>	Србија, Ђердап	Балкан	+
RU94	<i>Merodon armipes</i>	Serbia, Vršacke planine	Балкан	+
RU434	<i>Merodon armipes</i>	Турска, Илгас	Анадолија	+
RU448	<i>Merodon armipes</i>	Турска, Болу	Анадолија	+
RU449	<i>Merodon armipes</i>	Турска, Болу	Анадолија	+
RU465	<i>Merodon armipes</i>	Турска, Болу	Анадолија	+
RU467	<i>Merodon armipes</i>	Турска, Болу	Анадолија	+
RU468	<i>Merodon armipes</i>	Турска, Болу	Анадолија	+
RU471	<i>Merodon armipes</i>	Турска, Болу	Анадолија	+
RU472	<i>Merodon armipes</i>	Турска, Болу	Анадолија	+
RU86	<i>Merodon armipes</i>	Италија, Трентино	Апенинско полуострво	+
RU87	<i>Merodon armipes</i>	Италија, Трентино	Апенинско полуострво	+
RU79	<i>Merodon armipes</i>	Немачка	Средња Европа	+
AU1823	<i>Merodon armipes</i>	Француска, Монклар	Западна Европа	+
AU1824	<i>Merodon armipes</i>	Француска, Монклар е	Западна Европа	+
RU66	<i>Merodon auripes</i>	Грчка, Маинало	Балкан	+
RU62	<i>Merodon auripes</i>	Грчка, Маинало	Балкан	+
RU67	<i>Merodon auripes</i>	Грчка, Пиндос	Балкан	+
RU280	<i>Merodon auripes</i>	Црна Гора, Маглић	Балкан	+
RU279	<i>Merodon auripes</i>	Црна Гора, Маглић	Балкан	+
RU422	<i>Merodon auripes</i>	Србија, Мироч	Балкан	+
RU322	<i>Merodon auripes</i>	Украјина, Одешка област	Источна Европа	+
RU323	<i>Merodon auripes</i>	Украјина, Запорошка област	Источна Европа	+
RU324	<i>Merodon auripes</i>	Украјина, Запорошка област	Источна Европа	+
RU447	<i>Merodon auripes</i>	Турска, Болу	Анадолија	+
RU452	<i>Merodon auripes</i>	Турска, Болу	Анадолија	+
RU76	<i>Merodon auripes</i>	Турска, Боздаг	Анадолија	+
RU72	<i>Merodon auripes</i>	Турска, Боздаг	Анадолија	+
RU73	<i>Merodon auripes</i>	Турска, Боздаг	Анадолија	+
RU185	<i>Merodon hoplitis</i>	Црна Гора, Орјен	Балкан	-
RU186	<i>Merodon hoplitis</i>	Црна Гора, Орјен	Балкан	-
RU351	<i>Merodon hoplitis</i>	Црна Гора, Орјен	Балкан	-
RU152	<i>Merodon loewi</i>	Грчка, Аркадија	Балкан	+
RU150	<i>Merodon loewi</i>	Грчка, Маинало	Балкан	+
RU173	<i>Merodon loewi</i>	Грчка, Пиндос	Балкан	+
RU116	<i>Merodon loewi</i>	Р. С. Македонија, Кожуф	Балкан	+
RU135	<i>Merodon loewi</i>	Србија, Ђердап	Балкан	+
RU138	<i>Merodon loewi</i>	Србија, Ђердап	Балкан	+
RU142	<i>Merodon loewi</i>	Србија, Ђердап	Балкан	+
RU128	<i>Merodon loewi</i>	Србија, Сува планина	Балкан	+
RU178	<i>Merodon loewi</i>	Турска, Фетије	Анадолија	+
RU180	<i>Merodon loewi</i>	Турска, Фетије	Анадолија	+

AU957	<i>Merodon loewi</i>	Турска, Испарта	Анадолија	+
AU954	<i>Merodon loewi</i>	Турска, Испарта	Анадолија	+
RU263	<i>Merodon loewi</i>	Турска, Испарта	Анадолија	-
RU439	<i>Merodon loewi</i>	Турска, Илгас	Анадолија	+
RU441	<i>Merodon loewi</i>	Турска, Илгас	Анадолија	+
RU411	<i>Merodon loewi</i>	Грчка, Лезбос	Егејски архипелаг	+
RU410	<i>Merodon loewi</i>	Грчка, Лезбос	Егејски архипелаг	+
RU412	<i>Merodon loewi</i>	Грчка, Лезбос	Егејски архипелаг	+
RU183	<i>Merodon papillus</i>	Грчка, Лезбос	Егејски архипелаг	+
RU182	<i>Merodon papillus</i>	Грчка, Лезбос	Егејски архипелаг	+
RU184	<i>Merodon papillus</i>	Грчка, Лезбос	Егејски архипелаг	+
AU959	<i>Merodon papillus</i>	Турска, Испарта	Анадолија	+
AU960	<i>Merodon papillus</i>	Турска, Испарта	Анадолија	+
RU41	<i>Merodon trebevicensis</i>	Србија, Дубашница	Балкан	+
RU254	<i>Merodon trebevicensis</i>	Србија, Голија	Балкан	-
RU255	<i>Merodon trebevicensis</i>	Србија, Голија	Балкан	+
FIN27	<i>Merodon trebevicensis</i>	Црна Гора, Проклетије	Балкан	+
RU318	<i>Merodon trebevicensis</i>	Украјина, Крим	Источна Европа	+
RU45	<i>Merodon trebevicensis</i>	Турска Рахат	Анадолија	+
RU46	<i>Merodon trebevicensis</i>	Турска Рахат	Анадолија	+
RU47	<i>Merodon trebevicensis</i>	Турска Рахат	Анадолија	+
RU48	<i>Merodon trebevicensis</i>	Турска Рахат	Анадолија	+
RU50	<i>Merodon trebevicensis</i>	Турска Рахат	Анадолија	+
RUT1	<i>Merodon trebevicensis</i>	Србија, Дубашница	Балкан	+
RUT3	<i>Merodon trebevicensis</i>	Србија, Дубашница	Балкан	+
RUT4	<i>Merodon trebevicensis</i>	Србија, Дубашница	Балкан	+
AU1831	<i>M. portschinskyi</i>	Грузија, Имеретија	Кавказ	+
AU1830	<i>M. portschinskyi</i>	Грузија, Имеретија	Кавказ	-
AU1821	<i>Merodon ruficornis</i>	Француска, Тенде	Западна Европа	-
AU1822	<i>Merodon ruficornis</i>	Француска, Тенде	Западна Европа	+
RU210	<i>Merodon ruficornis</i>	Србија, Копаоник	Балкан	+
RU444	<i>Merodon ilgazense</i>	Турска, Илгас	Анадолија	+
RU445	<i>Merodon ovaloides</i>	Турска, Илгас	Анадолија	+
RU433	<i>Merodon ovaloides</i>	Турска, Илгас	Анадолија	+
RU435	<i>Merodon ovaloides</i>	Турска, Илгас	Анадолија	+

5.4.1. Утицај срединских карактеристика на генетички диверзитет

Merodon ruficornis групе врста

Применом маргиналног теста је у оквиру *DistLM* приступа процењен допринос појединачних срединских карактеристика на образац дистрибуције хаплотипова испитиваних митохондријских маркера. Резултати анализе засноване на секвенцама комбинованих фрагмената *COI* гена, указали су да варијације у количини падавина генерално имају највећи утицај у обликовању генетичког диверзитета овог митохондријског гена. Наиме, показано је да се међу срединским варијаблама које у статистички значајној мери објашњавају генетичку варијансу, налази укупно 5 биоклиматских карактеристика заснованих на нивоу преципитације: bio12 (годишња количина падавина), bio14 (преципитација у месецу са најмањом количином падавина), bio15 (сезонска количина падавина), bio17 (преципитација квартала са најмањом количином падавина), bio18, (количина падавина у току најтоплијег квартала). Удео генетичке варијације који је свака од ових варијабли појединачно објаснила креће се у опсегу од 4,95% у случају bio15, па све до 7,11% колико је описано од стране bio14 (Табела 19). Са друге стране, значајан допринос температурних карактеристика на дистрибуцију испитиваних *COI* хаплотипова, забележен је само у случају две варијабле — средње месечне температуре (bio2) и средње температуре квартала са највећом количином падавина (bio8), за које је показано да објашњавају 5,03%, односно 4,45% од укупне генетичке варијације. Међутим, средински фактор који у највећој мери објашњава диверзитет овог митохондријског гена код врста из *M. ruficornis* групе, представљен је једном геопросторном карактеристиком, односно географском дужином.

Поред тога је анализом некорелираних предиктора, путем секвенцијалног теста дефинисан најоптималнији модел регресије, односно сет срединских варијабли које, узимајући у обзир вредност AICс селекционог критеријума, заједно најбоље објашњавају испитивани генетички образац (Табела 20). Добијени сет је обухватао само по једну геопросторну и биоклиматску карактеристику, односно географску ширину и преципитација у месецу са најмањом количином падавина (bio14), за које је откривено да заједно објашњавају 12,86% од укупне варијације у дистрибуцији *COI* хаплотипова.

Табела 19. Приказ резултата добијених *DistLM* маргиналним приступом, који указује на допринос појединачних срединских варијабли на дистрибуцију хаплотипова комбинованих 3' и 5' фрагмента *COI* гена.

Варијабла	SS	р-вредност	Удео објашњене варијабилности
Lat	5 656,1	0,074	0,0418
Lon*	10 430	0,002	0,0771
alt	4 268,3	0,167	0,0315
bio1	1 451,9	0,881	0,0107
bio2*	6 809	0,04	0,0503
bio4	3 714,5	0,233	0,0274
bio5	1 793,1	0,748	0,0132
bio6	2 232,4	0,568	0,0165
bio8*	6 026,8	0,048	0,0445
bio9	2 367,6	0,508	0,0175
bio10	1 460,3	0,875	0,0108
bio11	1 737,7	0,761	0,0128
bio12*	9 168,8	0,011	0,0678
bio13	4 978,8	0,120	0,0368
bio14*	9 621,5	0,011	0,0711
bio15*	6 700,3	0,048	0,0495
bio16	5 508,7	0,080	0,0407
bio17*	9 400,4	0,012	0,0695
bio18*	8 388,9	0,015	0,0620
bio19	2 630,5	0,421	0,0194

*ниво значајности $p \leq 0,05$.

Табела 20. Сумарни приказ доприноса најоптималнијег регресионог модела у обликовању обрасца дистрибуције хаплотипова комбинованих 3' и 5' фрагмента *COI* гена.

Варијабла	SS вредност	AICc	р-вредност	Укупни удео објашњене варијабилности
LON	10 430	374,86	0.008	0,0771
bio14	6 962,9	374,45	0.028	0,1286

Сличан образац утицаја срединских фактора на дистрибуцију хаплотипова забележен је и на основу испитивања 5' фрагмента митохондријског *COI* гена. Наиме, маригалним тестом је утврђена статистичка значајност истих преципитационих варијабли, за које је претходно утврђено да показују највећи појединачни допринос у објашњавању дистрибуције хаплотипова дефинисаних на основу комбинованих секвенци 3' и 5' фрагмената *COI* гена (Табела 21). Међутим, уочено је да испитиване срединске карактеристике имају генерално виши ниво доприноса у обликовању генетичког диверзитета самог ДНК баркод региона, него што имају на комбиновану секвенцу 3' и 5' фрагмената *COI* гена. Са тим у вези, удео генетичке варијансе која је објашњена просторном варијацијом у количини падавина налази се у опсегу од 9,1% до 13,36%. Забележен је и значајан допринос биоклиматске варијабле која се односи на средњу температуру квартала са највећом количином падавина (bio8), при чему ова карактеристика температурног режима објашњава мањи удео генетичке варијабилности у поређењу са преципитационим условима средине. Поред тога је, као и на основу анализе комбинованих секвенци 3' и 5' фрагмената *COI* гена, откривено да географска дужина има највећи допринос у обликовању дистрибуције ДНК баркод хаплотипова (14,91%), при чему је статистичка значајност додатно забележена за још једну геопросторну карактеристику, односно географску ширину. Са друге стране, утврђивањем сета срединских варијабли који најбоље описује дистрибуцију ДНК баркод хаплотипова, показано је да, за разлику од анализе хаплотипова целог *COI* гена, најоптималнији модел регресије обухвата више геопросторних и биоклиматских карактеристика које у већој мери доприносе објашњењу уоченог обрасца генетичког диверзитета (Табела 22). Наиме, дефинисани сет заснован на заједничкој варијацији две геопросторне (LON и LAT) и три биоклиматске карактеристике (bio2, bio8, bio14), описао је укупно 42,92% укупног генетичког диверзитета израженог у дистрибуцији хаплотипова 5' *COI* гена

Табела 21. Приказ резултата добијених *DistLM* маргиналним приступом, који указује на допринос појединачних срединских варијабли на дистрибуцију хаплотипова 5' фрагмента *COI* гена.

Варијабла	SS вредност	р-вредност	Удео објашњене варијабилности
Lat*	6 888,4	0,031	0,0622
Lon*	16 523	0,001	0,1491
alt	2 767,4	0,269	0,0250
bio1	350,85	0,968	0,0032
bio2	3 353,7	0,202	0,0303
bio4	2 383,1	0,355	0,0215
bio5	1074,7	0,734	0,0099
bio6	512,5	0,934	0,0046
bio8*	7 090	0,028	0,0640
bio9	3 970,4	0,135	0,0358
bio10	561,27	0,919	0,0051
bio11	378,16	0,963	0,0034
bio12*	10 088	0,006	0,0910
bio13	3 020,7	0,253	0,0273
bio14*	14 801	0,003	0,1336
bio15*	12 213	0,005	0,1102
bio16	3 665,8	0,172	0,0331
bio17*	14 481	0,002	0,1307
bio18*	12 434	0,004	0,1122
bio19	1 685,4	0,499	0,0152

*ниво значајности $p \leq 0,05$.

Табела 22. Сумарни приказ доприноса најоптималнијег регресионог модела у обликовању обрасца дистрибуције хаплотипова 5' фрагмента *COI* гена.

Варијабла	SS вредност	AICc	р-вредност	Укупни удео објашњене варијабилности
LON	16 523	374,81	0,002	0,1491
bio14	8 354,9	372,54	0,015	0,2245
bio2	5 024,5	371,96	0,050	0,2699
bio8	6 607,7	370,27	0,022	0,3295
LAT	11 050	364,99	0,001	0,4292

Испитивањем улоге срединских карактеристика у обликовању дистрибуције хаплотипова 3' фрагмента *COI* гена, забележен је већи број геопросторних и биоклиматских фактора са статистички значајним доприносом (Табела 23). Са тим у вези, генетички диверзитет овог митохондријског маркера је у значајној мери објашњен варијацијама у географској ширини и дужини, затим температурним режимом средње месечне температуре (bio2), максималне температуре најтоплијег месеца (bio5), средње температуре квартала са највећом количином падавина (bio8), као и средње температуре квартала са најмањом количином падавина (bio9). Поред тога је статистички значајан допринос забележен и на основу појединачних утицаја истих преципитационих карактеристика, за које је претходно показано да у значајној мери објашњавају дистрибуцију хаплотипова дефинисаних на основу ДНК баркод региона, као и комбинованих фрагмената *COI* гена. Међутим, за разлику од ДНК баркод региона, генетички диверзитет 3' *COI* фрагмента је у већој мери објашњен биоклиматским променама у количини падавина, него геопросторном локацијом која је изражена у виду вредности географске ширине. Додатно је на основу секвенцијалног теста откривено да најоптималнији модел регресије, заснован на некорелисаним срединским варијалама, објашњава 37,19% од укупне варијације у дистрибуцији 3' *COI* хаплотипова (Табела 24). Добијени модел је представљен на основу две геопросторне (LON и LAT) и три биоклиматске карактеристике (bio2, bio8, bio14), за које је претходно показано да заједно такође најбоље описују и образац генетичког диверзитета заснованог на варијантама ДНК баркод региона (Табела 22).

Табела 23. Приказ резултата добијених *DistLM* маргиналним приступом, који указује на допринос појединачних срединских варијабли на дистрибуцију хаплотипова 3' фрагмента *COI* гена.

Варијабла	SS вредност	р-вредност	Удео објашњене варијабилности
Lat*	26 888	0,001	0,1505
Lon*	13 373	0,014	0,0749
alt	3 072,1	0,528	0,0172
bio1	3 660,5	0,421	0,0205
bio2*	21 335	0,002	0,1183
bio4	3 787,3	0,371	0,0212
bio5*	10 619	0,018	0,0594
bio6	3 138,4	0,510	0,0176
bio8*	9 964,5	0,033	0,0558
bio9*	13 249	0,009	0,0742
bio10	4 242,2	0,296	0,0237
bio11	4 345,6	0,309	0,0243
bio12*	21 284	0,001	0,1191
bio13	6 722,6	0,131	0,0376
bio14*	31 943	0,001	0,1788
bio15*	18 365	0,003	0,1028
bio16	6 867,8	0,105	0,0384
bio17*	30 603	0,001	0,1713
bio18*	34 311	0,001	0,1930
bio19	2 255,9	0,740	0,0126

*ниво значајности $p \leq 0,05$.

Табела 24. Сумарни приказ доприноса најоптималнијег регресионог модела у обликовању обрасца дистрибуције хаплотипова 3' фрагмента *COI* гена.

Варијабла	SS вредност	AICc	р-вредност	Укупни удео објашњене варијабилности
bio14	31 943	382,43	0,001	0,1788
LON	10 053	381,38	0,012	0,2351
bio8	7 472,8	381,13	0,026	0,2769
LAT	8 133,3	380,59	0,024	0,3224
bio12	8 837,9	379,66	0,008	0,3719

Сагледавањем резултата добијених на основу испитивања митохондријских *COI* и *Cyt b* гена, указано је на генерално нижи ниво доприноса појединачних срединских карактеристика у обликовању обрасца дистрибуције хаплотипова *Cyt b* гена (Табела 25). Међутим, слично као и код хаплотипова дефинисаних на основу секвенци ДНК баркод региона и комбинованих *COI* фрагмената, варијација у географској дужини се показала и као најзначајнији фактор обликовања генетичког диверзитета и *Cyt b* гена, док се међу биоклиматским факторима са статистички значајним доприносом претежно налазе карактеристике преципитационог режима — bio14 (преципитација у месецу са најмањом количином падавина), bio15 (сезонска количина падавина), bio17 (преципитација квартала са најмањом количином падавина), bio18, (количина падавина у току најтоплијег квартала). Насупрот томе, средња температура квартала са највећом количином падавина (bio8) представља једини температурни фактор који у значајној мери објашњава уочени образац дистрибуције *Cyt b* хаплотипова. Са друге стране, утврђено је да географска ширина и дужина, заједно са четири биоклиматске карактеристике (bio4, bio8, bio12, bio14) чине најоптималнији модел који објашњава 35,49% варијације у просторној дистрибуцији варијанти митохондријског *Cyt b* гена (Табела 26).

Табела 25. Приказ резултата добијених *DistLM* маргиналним приступом, који указује на допринос појединачних срединских варијабли на дистрибуцију хаплотипова *Cyt b* гена.

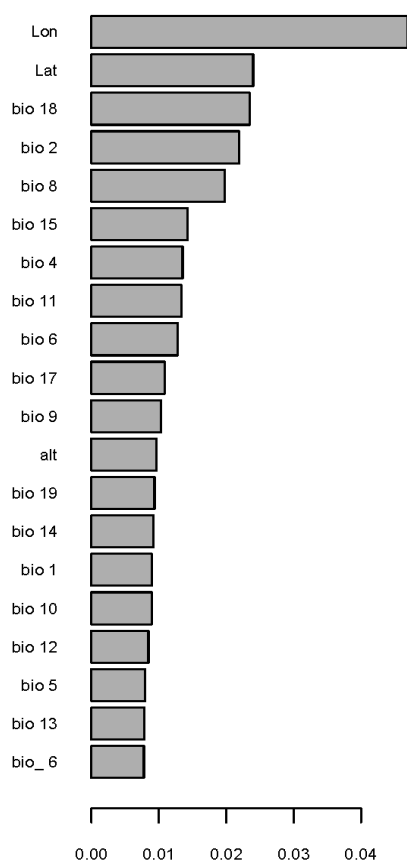
Варијабла	SS вредност	р-вредност	Удео објашњене варијабилности
Lat	2 982,9	0,214	0,0265
Lon*	6 846,7	0,024	0,0609
alt	1 772,7	0,528	0,0158
bio1	1 189,2	0,801	0,0106
bio2	1 767,4	0,571	0,0157
bio4	1 066,8	0,789	0,0095
bio5	1 287,9	0,757	0,0114
bio6	1 144,9	0,807	0,0102
bio8*	5 983,8	0,035	0,0532
bio9	3 315,5	0,175	0,0295
bio10	1 295,1	0,763	0,0115
bio11	1 181,5	0,797	0,0105
bio12	4 370,8	0,101	0,0388
bio13	2 052,2	0,451	0,0182
bio14*	5 913,8	0,041	0,0526
bio15*	5 539,4	0,050	0,0492
bio16	2 363,1	0,357	0,0210
bio17*	5 861,9	0,047	0,0521
bio18*	5 683,2	0,045	0,0505
bio19	1 156,2	0,832	0,0103

*ниво значајности $p \leq 0,05$.

Табела 26. Сумарни приказ доприноса најоптималнијег регресионог модела у обликовању обрасца дистрибуције хаплотипова *Cyt b* гена.

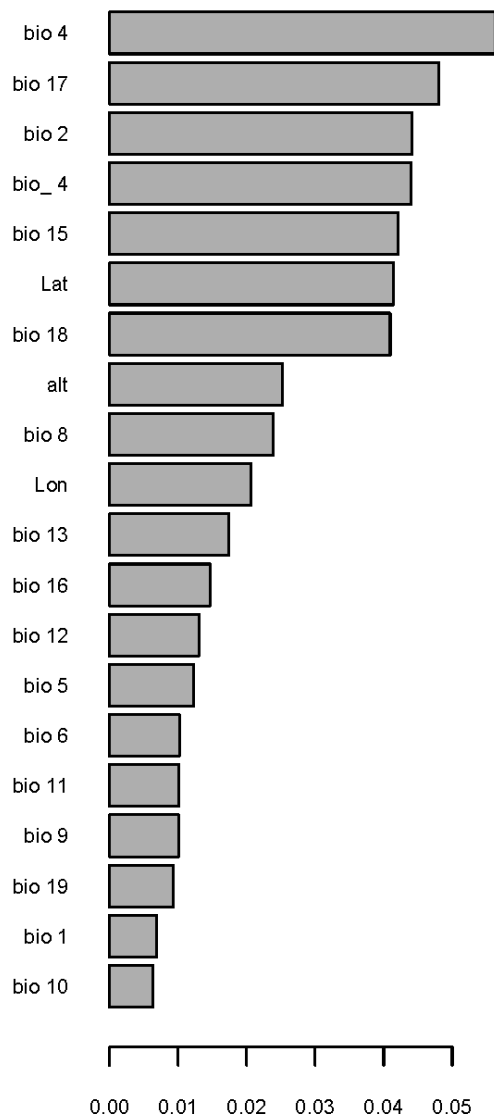
Варијабла	SS	AICc	р-вредност	Укупни удео објашњене варијабилности
LON	6 846,7	380,38	0,029	0,0609
bio14	6 537,2	379,53	0,032	0,1190
bio8	5 373,7	379,17	0,040	0,1668
LAT	9 281,1	376,55	0,005	0,2493
bio4	6 586,6	375,17	0,012	0,3078
bio12	5 295,8	374,45	0,019	0,3549

Утицај срединских фактора на генетички диверзитет врста из *M. ruficornis* групе истражен је применом *Gradient forest* алгоритма, на основу ког је процењено у којој мери појединачне биоклиматске и геопросторне карактеристике објашњавају уочену варијансу, представљену у виду фреквенције алела унутар дефинисаног сета *SNP* података. Сагледавањем добијених резултата, уочено је да испитивани средински фактори немају подједнак значај у обликовању обрасца генетичке варијабилности код различитих врста, те да се њихов допринос прецизности *GF* модела разликује у зависности од врсте (Слике 21, 22, 23, 24). Наиме, забележено је да геопросторне карактеристике, односно географска дужина и ширина објашњавају највећи удео варијансе у фреквенцији алела врсте *M. armipes* (Слика 21, Слика П6), док су од биоклиматских варијабли највише допринеле bio18 (количина падавина у току најтоплијег квартала), bio2 (средња месечна температура), као и bio8 (средња температура квартала на највећом количином падавина).



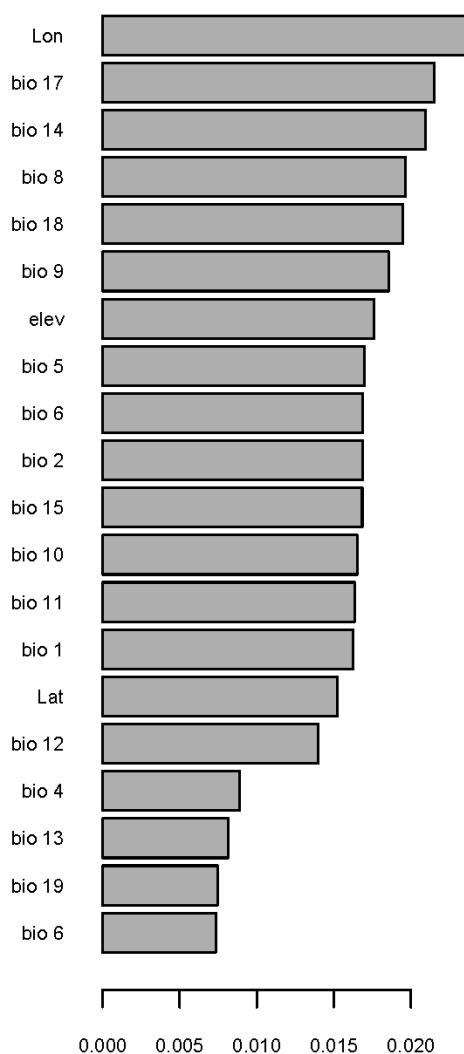
Слика 21. Приказ релативног доприноса појединачних срединских варијабли у предикцији фреквенције алела код *Merodon armipes* врсте, изражен у виду важности која је коригована R^2 грешком.

Насупрот томе, код врсте *M. auripes* је откривено да биоклиматске варијабле, односно bio4 (температурна сезоналност), bio 17 (преципитација квартала са најмањом количином падавина), bio2 (средња месечна температура), затим bio4 (преципитација у месецу са најмањом количином падавина) и bio15 (сезонска количина падавина), показују већи допринос постојећем генетичком диверзитету врсте, него што је то случај са геопросторним карактеристикама (Слика 22, Слика П7). Међутим, међу карактеристикама средине чије варијације у највећој мери објашњавају генетичку структуру, налазе се и географска ширина, као и bio18 (количина падавина у току најтоплијег квартала).



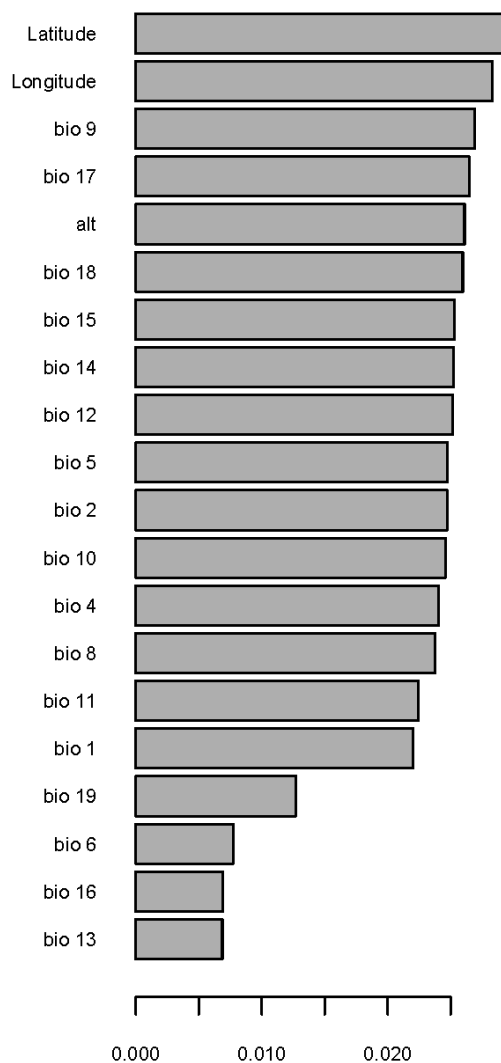
Слика 22. Приказ релативног доприноса појединачних срединских варијабли у предикцији фреквенције алела код *Merodon auripes* врсте, изражен у виду важности која је коригована R² грешком.

Добијени модел је, у односу на врсте *M. armipes* и *M. auripes*, указао на генерално нижи допринос појединачних фактора спољашње средине у обликовању обрасца генетичке варијабилности унутар врсте *M. loewi* (Слика 23, Слика П8), при чему је забележено да геопросторна варијабла, представљена географском дужином, показује највећи значај. Међу факторима који у већој мери доприносе моделу се налазе и показатељи климатских катактеристика током најсувљег и најтоплијег периода, односно bio 17 (преципитација у кварталу са најмањом количином падавина), bio14 (преципитација у месецу са најмањом количином падавина), bio18 (количина падавина у току најтоплијег квартала) и bio9 (средња температура у кварталу са најмањом количином падавина).



Слика 23. Приказ релативног доприноса појединачних срединских варијабли у предикцији фреквенције алела код *Merodon loewi* врсте, изражен у виду важности која је коригована R^2 грешком.

Поред тога, приближан утицај већине срединских карактеристика на генетички диверзитет откривен је код врсте *M. trebevicensis* (Слика 24, Слика П9). Међутим, сагледавањем резултата је откривено да геопросторне варијабле, представљене географском ширином и дужином, у највећој мери доприносе обрасцу генетичке диверзификације. Додатно је уочено да најмању улогу у обликовању генетичке структуре унутар ове врсте, имају биоклиматске карактеристике које се односе на ниво преципитације током најхладнијег периода, као и периода са највећом количином падавина: bio16 (преципитација у кварталу са највећом количином падавина), bio19 (количина падавина у току најхладнијег квартала), bio13 (преципитација у месецу са највећом количином падавина).



Слика 24. Приказ релативног доприноса појединачних срединских варијабли у предикцији фреквенције алела код *Merodon trebevicensis* врсте, изражен у виду важности која је коригована R^2 грешком.

6. Дискусија

6.1. Евалуација молекуларних алата од значаја за одређивање генетичког диверзитета унутар и између врста у оквиру *Merodon ruficornis* групе врста

6.1.1. Значај варијабилности секвенци митохондријских гена у таксономији *Merodon ruficornis* групе врста

Премда секвенце 3' и 5' региона митохондријског *COI* гена представљају често коришћен и изузетно користан алат у утврђивању и диференцијацији врста различитих родова осолених мува (нпр. Mengual и сар., 2006; Marcos-García и сар., 2011; Barkalov и Ståhls, 2015; Nedeljković и сар., 2015; Chroni и сар., 2017; Đan и сар., 2020; Nedeljković и сар., 2020; Vujić и сар., 2021b), откривено је да поседују лимитирану моћ резолуције у решавању таксономије унутар *Merodon ruficornis* групе врста. Претходним испитивањем 3' *COI* фрагмента, које је спроведено у оквиру студије молекуларног диверзитета представника *M. ruficornis* групе са Балкана, Milankov и сар. (2008) су идентификовали овај маркер као непотпуно информативан у дефинисању граница врста унутар групе. Наиме, секвенца 3' региона *COI* гена није доказана као успешан таксономски алат у раздвајању морфолошки јасно диференцираних врста *M. armipes* и *M. loewi*. Сумирањем резултата ове дисертације откривено је да поред претходно забележеног постојања заједничког 3' *COI* хаплотипа, јединке *M. armipes* и *M. loewi* такође деле и хаплотип у оквиру ДНК баркод региона. Присуство заједничких хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' фрагмената *COI* гена забележено је како између балканских популација *M. armipes* и *M. loewi*, тако и између јединки *M. armipes* и *M. loewi* са Анадолијског полуострва и морфолошки дефинисане врсте *M. papillus* која води порекло са Лезбоса и Анадолијског полуострва. Поред непотпуног раздвајања врста *M. armipes* и *M. loewi* пореклом са истог полуострва, уочени су дељени 5' *COI* хаплотипови између географски удаљених представника ових врста, односно између одређених јединки *M. armipes* са Балканског и *M. loewi* са Анадолијског полуострва. Ограничена моћ *COI* гена уочена је и приликом примене ДНК баркодинга у циљу проучавања *Merodon* таксона са Лезбоса, при чему је откривено да врсте *M. loewi* и *M. papillus* пореклом са овог острва деле исту ДНК баркод секвенцу (Ståhls и сар., 2009). Са друге стране, додатним испитивањем у оквиру

ове дисертације установљено је да, за разлику од 5' *COI* фрагмента, 3' регион овог гена указује на разлику у хаплотиповима између јединки *M. loewi* и *M. papillus* које воде порекло са острва Лезбос. Међутим, вредност некориговане дистанце је, и поред разлике у секвенци 3' фрагмента *COI* гена, указала на изузетно низак ниво диференцијације између јединки ове две врсте пореклом са Лезбоса.

Анализом секвенци комбинованих фрагмената *COI* гена откривено је да просечна вредност некориговане дистанце између парова врста *M. ruficornis* групе износи 2,77%, при чему је сличан образац уочен и молекуларним испитивањем секвенци ДНК баркод региона, на основу ког је забележена просечна стопа удаљености у вредности од 2,78%. Вредности некориговане дистанце су, у складу са очекивањима, указале на изузетно низак ниво дивергенције између балканских представника *M. armipes* и *M. loewi*, као и између *M. armipes* са Анадолијског полуострва и јединки врста *M. loewi* и *M. papillus* пореклом са Анадолијског полуострва и острва Лезбос. Веома ниска стопа диференцијације у односу на јединке *M. armipes*, *M. loewi* и *M. papillus*, је забележена и за врсту *M. lamellatus* која је такође сакупљена на Анадолијском полуострву. Поред тога је за остале испитиване парове врста утврђено да се, на основу секвенци комбинованих *COI* фрагмената, вредност некоригованих дистанци креће у опсегу од 0,58% до 5,42%, односно између 0,65% и 5,22% уколико се у обзир узме само ДНК баркод регион. Иако су неке од ових вредности ниже у односу на стандардну ДНК баркод празнину од 2%, оне се ипак налазе у распону вредности од 0,3% до 2,5% који је претходно забележен код криптичних и блиско сродних врста осоликих мува (Marcos-García и сар., 2011; Vujić и сар., 2013; Nedeljković и сар., 2015; Popović и сар., 2015; Šašić и сар., 2016; Radenković и сар., 2018; Šašić и сар., 2016; Vujić и сар., 2020a). Међутим, откривено је да у овај опсег улазе и вредности некоригованих дистанци између различитих популација врста *M. armipes*, *M. loewi*, *M. trebevicensis* и *M. auripes*, указавши тиме на висок степен диференцијације и присуство линија са независном еволуцијом мтДНК унутар морфолошки јасно дефинисаних врста. Свакако треба имати у виду да стандардизована вредност дивергенције секвенци не може бити дефинисана за све таксоне и молекуларне маркере генерално, посебно уколико се у обзир узму случајеви који указују на присуство дељеног ДНК баркод хаплотипа између морфолошки јасно одвојених врста. Додатно, код неких врста забележене су вредности које превазилазе карактеристичну стопу дивергенције између врста у одређеној групи (Cognato, 2006; Cognato, 2006; Mengual и сар., 2006; Marcos-García и сар., 2011; Haarto

и Ståhls, 2014; Popović и сар., 2015). Према томе, истиче се потреба за свеобухватним сагледавањем нивоа генетичке дивергенције за сваку групу врста појединачно, при чему уочени образац треба посматрати као хипотезу коју је неопходно разјаснити у светлу других таксономски релевантних информација (Šašić и сар., 2016).

Делимична резолуција митохондријских маркера у сагледавању таксономских граница унутар *M. ruficornis* групе је додатно потврђена испитивањем варијабилности секвенце митохондријског *Cyt b* гена, на основу које је забележено да врсте *M. armipes*, *M. loewi* и *M. papillus*, поред хаплотипова *COI* гена, деле и заједничке *Cyt b* хаплотипове. Међутим, за разлику од *COI* региона, анализа секвенци *Cyt b* гена није указала на разлику између представника врста *M. armipes* и *M. trebevicensis* пореклом са географски удаљених локалитета, што је донекле и могло бити очекивано уколико се, заједно са мањом варијабилношћу *Cyt b* гена, у обзир узме и веома низак степен генетичке дивергенције у секвенци *COI* гена која је утврђен између јединки ових популација. Генска стабла конструисана на основу *Cyt b* секвенци, као и комбинованих 3' и 5' фрагмената *COI* гена су и поред успешне идентификације већине испитиваних врста, потврдила да оба испитивана митохондријска гена деле истоветни таксономски сигнал који отежава утврђивање граница између врста *M. armipes*, *M. loewi* и *M. papillus*, за које је доказано да без обзира на јасну морфолошку диференцијацију, деле исте или генетички веома блиске хаплотипове. Додатни недостатак примене мтДНК, као маркера у разјашњавању таксономских односа унутар *M. ruficornis* групе, огледа се у изузетно високој генетичкој диференцијацији унутар морфолошки јасних врста *M. armipes* и *M. trebevicensis*, која је довела до уметања јединки ових врста у различите класе унутар стабала митохондријских гена.

Треба имати у виду да је примена митохондријских маркера у разјашњавању таксономских односа између блиско сродних врста неретко ограничена услед постојања еволуционих процеса као што су хибридризациона интрогресија и непотпуно раздвајање генских линија, а чије деловање може узроковати нижи степен дивергенције мтДНК, као и присуство дељених хаплотипова између врста (Veebe, 2018). Процес интрогресије подразумева инкорпорацију гена једне врсте у геном друге и најчешће настаје као последица хибридикационих догађаја између две врсте праћених повратним укрштањем (Anderson и Hubricht, 1938; Anderson, 1949). У складу са овом дефиницијом, потенцијални разлог присуства заједничке ДНК баркод секвенце

код јединки морфолошки јасно одвојених врста *M. ruficornis* групе пореклом са острва Лезбос — *M. loewi* и *M. papillus*, Ståhls и сар. (2009) проналазе управо у еволуционим процесима интрогресије и непотпуног раздвајања генских линија, за које је утврђено да се често одвијају унутар група и/или комплекса блиско сродних врста, код којих се специјација одиграла релативно скоро. Међутим, Milankov и сар. (2008) су у својој студији закључили да присуство идентичног *COI* хаплотипа код јединки врста *M. armipes* и *M. loewi* са Балканског полуострва тешко може представљати резултат интрогресије, с обзиром да ове две врсте насељавају алопатричке локалитете и да се као такве географски преклапају само у малој мери, те објашњење проналазе у задржаном полиморфизму пореклом од заједничког претка. Са друге стране, резултати ове дисертације су указали на заједничко кластероване и присуство дељених, односно блиских хаплотипова код јединки различитих врста сакупљених на истим и/или географски блиским поднебљима (*M. armipes* и *M. loewi* са Балкана и из Украјине, као и *M. armipes*, *M. loewi* и *M. papillus* са Анадолијског полуострва и Лезбоса), али и код јединки са удаљенијих локалитета, што се може видети на примеру *M. loewi* из Испарте, који за разлику од осталих популација ове врсте пореклом са Анадолијског полуострва, показује присуство дељених хаплотипова (5' *COI* фрагмент) и ниске мтДНК дивергенције у односу на *M. armipes* са Балкана и из Украјине. Поред тога, испитивањем варијабилности митохондријских гена откривено је да се јединке *M. armipes* из Италије и Западне Европе, услед ниског нивоа генетичке дивергенције, групишу заједно са географски удаљеним представницима врсте *M. trebevicensis* које су прикупљене на локалитетима унутар Балканског и Анадолијског полуострва. Према томе, перманентна неподударност између морфолошких и митохондријских маркера у утврђивању таксономских граница унутар *M. ruficornis* групе је, поред заједничког кластероване и присуства дељених хаплотипова између географски блиских, али и удаљених представника различитих врста, додатно подржана високом стопом мтДНК дивергенције између популација у оквиру врста *M. armipes*, *M. loewi*, *M. trebevicensis* и *M. auripes*, за које је претходно утврђено да према морфолошким карактеристикама представљају јасно дефинисане и целовите таксоне. Уочени диверзитет митохондријских региона може представљати средински обликован сигнал инкорпорације гена једне врсте у геном друге, настале као резултат процеса хибридизационе интрогресије између предачких линија у прошлости, које су услед климатских промена током плеистоценских циклуса глацијације и интерглацијације највероватније у одређеним периодима насељавале иста рефугијална подручја, те су, у

почетним фазама генетичког одвајања, због релативно кратког периода независне еволуције ступале у репродуктивне односе. Поред тога, могуће објашњење за уочени образац варијабилности испитиваних митохондријских гена, може се тражити и у унутарћелијским симбионтским микроорганизмима, као што су бактерије из рода *Wolbachia*, које услед свог деловања на диверзитет мтДНК, могу довести до смањене учинковитости и нелогичности у резултатима који су добијени испитивањем нуклеотидне секвенце митохондријских маркера (Hurst и Jiggins, 2005; Klopstein и сар., 2016; Gaunet и сар., 2019; Bruzzese и сар., 2022).

Узимајући у обзир да су региони мтДНК омогућили идентификацију већине таксона, при чему су резултати ове дисертације засновани на варијабилности *COI* фрагмената допринели опису три за науку нове врсте из *M. ruficornis* групе — *M. acutus*, *M. trispinus* и *M. fulvitaris* (Vujić и сар., 2022b), може се закључити да су се анализирани митохондријски гени у одређеној мери показали као користан алат за испитивање молекуларне таксономије ове групе. Ипак, треба имати у виду да се анализи ових митохондријских маркера мора приступити критички и са дозом опреза, с обзиром на доказану ограниченост њихове резолуције у утврђивању јасних таксономских граница код одређених морфолошки дефинисаних врста *M. ruficornis* групе.

6.1.2. Значај варијабилности секвенци једарних региона у таксономији *Merodon ruficornis* групе врста

Познато је да испитивање генетичких региона различитог порекла пружа свеобухватнији увид у еволуционе односе таксона, чиме се омогућава поузданије утврђивање врста, односно разјашњавање њихових граница и филогенетских односа. Стога се у студије таксономије и систематике генерално, поред митохондријских маркера, уводи и анализа секвенци једарне ДНК са циљем спречавања грешке у закључивању, која нехотице може настати као резултат деловања различитих еволуционих процеса на диверзитет митохондријског генома. У прилог томе иду резултати претходних истраживања биолошке разноврсности *Merodon* рода, указујући на важност сагледавања варијабилности једарних рРНК гена и њихових интергенских региона приликом решавања таксономских питања и односа (Коџић-Тубић и сар., 2018; Mengual и сар., 2006; Šašić Zorić и сар., 2018). Премда *D2-3* регион *28S* рРНК једарног

гена представља често коришћен маркер, корисност *ITS2* региона је неретко ограничена услед потешкоћа у амплификацији саме секвенце. Међутим, и поред проблема у успешности приликом генерисања секвенце, доказан је изузетан значај *ITS2* региона у разјашњавању таксономских изазова унутар *M. ruficornis* групе врста.

Анализа варијабилност нуклеотидне секвенце *ITS2* региона без очитаних индела је, за разлику од митохондријских гена, успешно раздвојила врсте *M. armipes* и *M. loewi* пореклом са Балкана, али је са друге стране јасно идентификовала само једну врсту — *M. acutus*, као и неке од популација у оквиру *M. loewi* и *M. ruficornis*. Насупрот томе, анализа секвенци *ITS2* региона са очитаним инделима омогућила је дефинисање јединствених генотипова за готово сваку од морфолошки дефинисаних врста, чиме је овај регион доказан као потенцијални дијагностички алат у дефинисању таксономских граница унутар *M. ruficornis* групе врста. Међутим, присуство дељеног генотипа је забележено између врста *M. papillus* са Лезбоса и *M. ovaloides* сакупљених на Анадолијском полуострву, које су јасно дефинисане применом морфолошких и митохондријских маркера. Додатни значај примене *ITS2* региона као алата у разјашњавању *M. ruficornis* групе огледа се у идентификацији балканских и турских популација у оквиру врста *M. auripes*, *M. loewi* и *M. trebevicensis*. Штавише, диференцијација према географском пореклу је забележена и код представника врсте *M. ruficornis*, и то између јединки пореклом из Француске, Украјине и са Балкана. Поред тога је важно напоменути да *ITS2* регион, у сагласности са морфолошким карактерима, потврђује интегритет врсте *M. armipes*, као и *M. trebevicensis* са Балкана, мада је идентитет ових таксона доведен у питање услед полифилетске еволуције засноване на митохондријским маркерима.

Иако је према резултатима претходне студије (Јао и сар., 2010) *ITS2* регион омогућио идентификацију 91,7% испитиваних животињских врста, овај једарни маркер није пронашао широку примену у молекуларној таксономији осоликих мува, што је највероватније узроковано потешкоћама у самој амплификацији и генерисању секвенце. Стога се, у односу на митохондријске гене, *ITS2* регион у далеко мањој мери користи приликом разграничавања блиско сродних врста, посебно из рода *Merodon*. Међутим, с обзиром на присуство генотипова који су специфични за готово све врсте, али и популације *M. ruficornis* групе, секвенца *ITS2* региона са бинарно представљеним инделима показује изузетан значај у одређивању таксономског идентитета, како

адултних, тако и јединки у ранијим фазама развића, током којих је изузетно тешко идентификовати врсту само на основу морфолошких карактера. Поред тога је показано да женке различитих врста из *M. ruficornis* групе карактерише међусобна морфолошка сличност, те да се једино могу разликовати сагледавањем суптилних разлика, док за женке неких врста нису утврђени дијагностички карактери (Vujić и сар., 2012). Према томе, овај једарни регион представља користан алат приликом одређивања таксономске припадности врста из *M. ruficornis* групе, посебно у случајевима када су женке различитих таксона морфолошки сличне и/или немају дијагностички препознатљиве карактере. Узимајући у обзир све претходно наведено, секвенца *ITS2* региона са бинарно записаним инделима има потенцијал изузетно моћног маркера, који би засигурно требало узети у обзир као додатни алат приликом идентификације таксона *M. ruficornis* групе применом метода молекуларне идентификације.

Услед ниже стопе еволуционих промена у односу на претходно поменуте маркере, *D2-3* регион експанзије *28S* рРНК гена махом проналази примену у реконструкцији филогенетских односа осоликних мува на нивоу виших таксономских категорија (Mengual и сар., 2008; 2015; Stahls и сар., 2004). Поред тога се овај једарни маркер, у комбинацији са варијабилношћу секвенце *COI* гена, доказао информативним и приликом испитивања таксономије врста код појединих родова осоликних мува (Chroni и сар., 2018; Radenković и сар., 2018; Šašić Zorić и сар., 2020; Vujić и сар., 2020b, 2021c), а показао се значајним и као независтан маркер у решавању таксономије *Merodon nanus* групе врста (Kočiš Tubić и сар., 2018). Свакако треба имати у виду да је, за разлику од *COI* гена и *ITS2* региона, секвенца *28S* рРНК гена по правилу конзервативнија, те да најчешће не показује висок ниво дивергенције између блиско сродних врста (Mengual et al., 2006; Patwardhan et al. 2014; Šašić Zorić et al., 2018).

Приликом испитивања молекуларног диверзитета *M. ruficornis* групе, варијабилност *D2-3* региона *28S* рРНК гена је омогућила додатну подршку у дефинисању одређених врста, али и у откривању унутарспецијске диференцијације, посебно када се уз варијабилност нуклеотидне секвенце користе и подаци засновани на инсерцијама и делецијама. Тако је применом индела као додатног сигнала, откривено присуство генотипова који једнозначно одређују врсте *M. auripes*, *M. acutus*, *M. trispinus*, *M. fulvitaris*, *M. loewi* и *M. gallicus*. Такође је уочено и јасно издвајање јединки *M. loewi* са Лезбоса, затим *M. armipes* из Западне Европе, као и представника

врсте *M. armipes* пореклом из Италије и са Јадранског приморја. Додатни значај у таксономији *M. ruficornis* групе је представљен непостојањем заједничких генотипова између врста *M. armipes*, *M. loewi* и *M. papillus*, за које је упркос јасним морфолошким разликама и диференцијацији на основу *ITS2* региона, показано да деле идентичне хаплотипове митохондријских маркера. Међутим, варијабилност испитиваног региона *28S* рРНК гена се није показала довољно информативном за идентификацију свих таксономских граница унутар *M. ruficornis* групе, што се и могло очекивати с обзиром на ограничену резолуцију овог гена у молекуларној таксономији блиско сродних врста, која је узрокована нижом стопом еволуционих промена у поређењу са анализираним протеин кодирајућим генима (*COI*, *Cyt b*) и регионом интергенског спејсера (*ITS2*).

Постоје опсежни докази да инсерције и делеције представљају очуване филогенетске сигнале, те да су као такве од информативног значаја за утврђивање филогеније и таксономских односа (Simmons и Ochoterena, 2000; Ogden и Rosenberg, 2007; Belinky и сар., 2010; Рашко и сар., 2011; Warnow, 2012; Yuri и сар., 2013; Boutte и сар., 2019). Примена индела као молекуларног алата може бити изузетно корисна, не само из разлога што пружа додатни извор података из претходно секвенцираних региона, већ и због тога што мутације које узрокују промену у дужини секвенце могу бити конзервираније у поређењу са нуклеотидним супституцијама (Ingvarsson и сар., 2003; Belinky et al., 2010; Nagy et al., 2012). Како би се проценио значај инсерција и делеција као алата у молекуларној таксономији *M. ruficornis* групе, приступљено је коришћењу две различите стратегије третирања нуклеотидних празнина унутар поравнања једарних секвенци: нуклеотидне празнине су потпуно искључене из анализе као непостојећи подаци, или су применом алгоритма заснованог на једноставном превођењу индела представљене у виду матрице бинарног записа. Иако метода једноставног превођења индела у бинарни запис не представља једини приступ кодирања нуклеотидних празнина, предност овог алгоритма се осликава у лакој имплементацији и очувању конзервативности сигнала, омогућавајући притом евалуацију индела као информације од таксономског и филогенетског значаја (Nagy et al., 2012).

Добијени резултати су указали да примена индела као додатног сигнала поспешује резолуцију испитиваних једарних маркера, доказавши тиме важност овог молекуларног алата у решавању таксономских питања у оквиру *M. ruficornis* групе

врста. Посебан таксономски значај инсерција и делеција уочен је приликом испитивања *ITS2* региона, за који је утврђено да представља потенцијалну замену традиционалном ДНК баркод региону, уколико се у анализу укључе и информације засноване на варијацији дужине секвенце. Током претходних истраживања таксономије рода *Merodon*, откривен је могући потенцијал индела у раздвајању две морфолошки криптичне врсте из *Merodon caerulescens* комплекса (Šašić Zorić и сар., 2018). Међутим, иако је дивергенција секвенце *COI* гена подржала разграничење ове две криптичне врсте, доводи се у питање да ли варијација у дужини *ITS2* региона заиста представља врсти специфичан карактер, или је пак у питању унутарспецијски феномен, будући да су секвенце овог једарног маркера очитане код само једног представника сваке од анализираних врста. Разлика у дужини *ITS2* региона откривена је и између јединки врсте *M. albifrons* пореклом из Шпаније, при чему је ова варијабилност интерпретирана као интраспецијска (Mengual и сар., 2006). Сумирањем резултата ове дисертације установљено је да нуклеотидне *ITS2* секвенце у комбинацији са инделима омогућавају дефинисање генотипова који су јединствени готово за сваку врсту и популацију унутар *M. ruficornis* групе, чиме се потврђује дијагностички значај индела као таксономског алата код ове групе врста.

6.1.3. Значај геномских података у таксономију *Merodon ruficornis* групе врста

Анализе засноване на комбинованим нуклеотидним секвенцама пет митохондријских и једарних региона без кодираних индела (3' и 5' фрагменти *COI* гена, *Cyt b* ген, 28S рРНК ген и *ITS2* регион), нису биле максимално успешне у разјашњавању таксономије и пружању јасне слике филогенетских односа унутар *Merodon ruficornis* групе врста. Добијена филогенетска стабла су поред непотпуног раздвајања врста *M. armipes*, *M. loewi* и *M. papillus*, указала на учесталост парафилије и полифилије врста. Насупрот томе, примена података заснованих на бинарно кодираним инделима је, заједно са нуклеотидном варијабилношћу ДНК секвенци, допринела разграничењу свих испитиваних таксона, тако да је на стаблима уочено раздвајање јединки *M. armipes*, *M. loewi* и *M. papillus*, премда је у оквиру врста *M. armipes* и *M. loewi* забележено да се јединке, у зависности од локалитета прикупљања, групишу у различите кластере. Међутим, за разлику од Бајесовог закључивања, стабло највеће вероватноће није пружило статистичку подршку клади која у односу на *M. loewi*, одваја балканске и украјинске представнике врсте *M. armipes*, што може бити у вези са

недостатком таксономске информативности коју носи *ITS2* регион, с обзиром да секвенца овог нуклеарног маркера није генерисана код *M. armipes* и *M. loewi* из Украјине, те се услед ограничене резолуције мтДНК маркера, разлика између ових јединки заснива на мање варијабилном *28S* рРНК гену, односно на мутацијама које доводе до промене у дужини секвенце овог нуклеарног гена. Поред тога, ниска *bootstrap* подржаност у вредности од 62 на *ML* стаблу, забележена је за кладу која одговара врсти *M. loewi* са острва Лезбос и турске планине Илгаз, при чему је читавање секвенце *ITS2* региона било такође неуспешно за узорак прикупљене са локалитета на Илгазу. Међутим, иако се у литератури вредности *bootstrap* подршке у распону од 70 до 95 сматрају прихватљивим, док се за високо значајну подржаност узимају вредности изнад 95, ниске вредности не морају нужно представљати показатељ грешака у топологији стабала, већ могу бити објашњене у светлу скорије дивергенције између блиско сродних врста. Наиме, кратак период независне еволуције у случају сестринских врста може довести до ниске подршке кладама, чак и онда када су врсте морфолошки различите и/или поседују јединствене мутације (Collins и Cruickshank, 2012).

Премда је имплементација сигнала заснованог на бинарно представљеним инделима указала на монофилетску еволуцију врсте *M. auripes*, филогенетска стабла базирана на матрици секвенци која поред нуклеотида испитиваних региона садржи и бинарно записане индеље, су и даље указивала на полифилију и парафилију таксона, и то за врсте *M. armipes*, *M. trebevicensis* и *M. loewi*. Биолошки процеси хибридизационе интрогресије, хоризонталног трансфера гена, као и непотпуно раздвајање генских линија које неретко прати блиско сродне врсте са скоријом специјацијом, најчешће представљају водеће узрочнике полифилије и парафилије врста (Funk и Omland, 2003; Harrison и Larson, 2014). Према томе, добијени филогенетски односи, како је претходно и напоменуто, могу представљати сигнал непотпуног раздвајања линија и инкорпорације гена једне врсте у геном друге, при чему је уочени образац у мањој или већој мери обликован под утицајем срединских варијабли на генетички диверзитет *M. ruficornis* групе.

Треба истаћи да су информације о пореклу важне у разумевању диверзитета врста, али нису неопходне за раздвајање врста и њихов опис (Goulding и Dayrat, 2016). Међутим, поуздана процена филогенетских односа и јасно утврђивање таксономских

граница врста из *M. ruficornis* групе, захтева примену мултилокусног приступа, који осликава различите делове генома и на тај начин пружа свеобухватнији увид у процесе диференцијације и еволуциону историју групе. Како је панел традиционалних генетичких маркера који се користи у молекуларној таксономији осоликних мува ограничен, у овом истраживању је применом *ddRAD-seq* методе, генерисан сет података који укључује више хиљада молекуларних маркера дистрибуираних широм генома.

Анализе геномских података добијених *ddRAD-seq* методом су успешно разјасниле таксономију *M. ruficornis* групе, омогућивши раздвајање и јасну идентификацију свих испитиваних врста, као и присуства интраспецијске диференцијације код врста са широм дистрибуцијом, која је представљена груписањем јединки пореклом са истог или блиских поднебља. Наиме, *ddRAD* филогенетско стабло највеће вероватноће је, за разлику од анализе засноване на варијабилности пет комбинованих митохондријских и једарних региона, пружило јасну слику еволуционих односа између испитиваних врста. Указавши на реципрочну монофилију свих испитиваних врста, конструисано *ML* стабло је потврдило постојање јасних таксономских граница између врста унутар групе. Висока *bootstrap* вредност од 100 пружила је значајну статистичку подршку уоченој монофилији врста, указујући на присуство великог броја генетичких података, односно различитих локуса који показују стабилну диференцијацију између врста. Добијени резултати подржавају конзистентност таксономских граница у оквиру *M. ruficornis* групе, тако да су дефинисане врсте представљене као линије са јединственом еволуционом историјом, између којих долази до ограничења или потпуног одсуства у протоку гена. Уочени образац је додатно потврђен методом коалесценције, на основу које су све испитиване врсте процењене као јединствени таксони које одликује независни еволуциони ток и чије границе су у сагласности са морфолошким карактерима. Према томе је, услед одсуства парафилетске и полифилетске еволуције на геномском нивоу, одбачена идеја додатног раздвајања унутар врста *M. armipes*, *M. loewi*, *M. trebevicensis* и *M. auripes*, те су оне представљене у виду јединствених морфолошки јасних целина, унутар којих постоји одређена популациона структурираност.

Претпоставља се да врсте са високом стопом интрогресије показују општу сродност која је представљена заједничким груписањем врста на основу недавно

интродукованих гена, те да се раздвајање у секвенцама једарне ДНК не може очекивати уколико између таксона није дошло до успостављања репродуктивне баријере (Eaton и сар., 2015). Са тим у вези, несклад између филогеније засноване на митохондријским и једарним генетичким маркерима често може указати на догађај интрогресије из прошлости, или пак на текући и/или скорашњи процес размене генетичког материјала између таксона (Linnen и Farrell, 2007; Papakostas и сар., 2016; Suchan и сар., 2017; Ivanov и сар., 2018; Dong и сар., 2022). Насупрот секвенцама митохондријских гена, *ddRAD* подаци су успешно раздвојили испитиване врсте, потврђујући тиме валидност, како морфолошких граница, тако и таксономске информативности *ITS2* једарног региона, на основу које је забележена различитост између јединки врста *M. armipes*, *M. loewi* и *M. papillus*. Међутим, приликом интерпретације резултата треба имати у виду да услед недостатка референтног генома није могуће утврдити положај анализираних *ddRAD* секвенци у геному. Са друге стране, уколико се у обзир узме веома мала величина митохондријског генома у односу на једарни, готово је невероватно да су ови локуси смештени искључиво унутар мтДНК, те је вероватније да већи удео испитиваних *ddRAD* секвенци представља регионе једарног генома. У прилог неподударности између једарног и митохондријског диверзитета *M. ruficornis* групе, поред резолуције *ITS2* једарног региона који је анализиран у оквиру ове дисертације, иду и резултати добијени испитивањем алозима, за које су *Milankov* и сар. (2008) открили да, за разлику од митохондријског 3' *COI* региона, успешно раздвајају балканске представнике врста *M. armipes* и *M. loewi*. Са развојем нових молекуларних маркера, долази до све чешћег откривања мито-једарног несклада у резултатима студија које изучавају таксономске односе и специјацију унутар група и/или комплекса блиско сродних врста, при чему се као главни узрочници наводе процес интрогресије, као и непотпуно раздвајање генских линија (Bonnet и сар., 2017; Firreno и сар., 2020; Mao и Rossiter, 2020; Andersen и сар., 2021; Dong и сар., 2022; deRaad и сар., 2023). Феномен непотпуног раздвајања генских линија је представљен задржаним полиморфизмом пореклом од заједничког претка, чиме се имплицира на кратак период независне еволуције, током ког није прошло довољно времена да диференцијација између различитих линија доведе до фиксирања разлика унутар различитих геномских региона (Ballard и Whitlock, 2004). С обзиром на филогенетски положај врсте *M. armipes*, за коју је анализом *ddRAD* геномских података откривено да се у виду засебне кладе издваја у односу на све остале врсте из *M. ruficornis* групе, мало је вероватно да непотпуно раздвајање генских линија може

представљати објашњење за образац генетичке блискости који је на основу митохондријских гена уочен између јединки *M. armipes* и врста *M. loewi* и *M. papillus*. Са друге стране, за врсте *M. loewi* и *M. papillus* је откривено да представљају филогенетски ближе таксоне, али је на основу резултата *ML* анализе, као и коалесцентног стабла врста показано да су у питању таксони са независним током еволуционе историје. Према томе, добијени резултати подржавају претпоставку да се главни узрок таксономских и филогенетских нејасноћа у митохондријском диверзитету *M. ruficornis* групе, највероватније огледа у процесу инкорпорације митохондријског генома једне врсте у другу, насталог као резултат хибридизационих догађаја након којих је, услед стохастичких процеса, адаптивне вредности или присуства ендосимбионта, могло доћи до фиксирања одређене мтДНК варијанте у популацији.

Све већи број студија указује на изузетну резолуцију и значај примене *RAD-seq* метода, као молекуларног алата у студијама генетичке разноликости које за циљ имају утврђивање таксономских граница, односно процену филогеније и еволуционе историје немодел организама (нпр. Ivanov и сар., 2018; Dincă и сар., 2019; Léveillé-Bourret и сар., 2019; Rancilhac и сар., 2019; Prous сар., 2020; Sihvonen и сар., 2020; Glon и сар., 2021; Říčan и сар., 2021; Salokannel и сар., 2021; Dong и сар., 2022; Kim и сар., 2022; Dianat и сар., 2023; Ivanov и сар., 2023). Генерисањем великог броја генетичких маркера који у виду *SNP* података осликавају различите делове генома, *ddRAD-seq* омогућава свеобухватну и темељну основу у проучавању диверзитета и разјашњавању односа унутар таксономски изазовних група и комплекса врста, као што је то случај са врстама *M. ruficornis* групе. Приступ заснован на геномским технологијама нове генерације, за који је на основу претходних истраживања показано да пружа велики допринос у решавању таксономских питања код блиско сродних врста, коначно је омогућио успешно разјашњење таксономских граница и филогенетских односа унутар *M. ruficornis* групе, утврдивши да све испитиване врсте представљају јасно одвојене и морфолошки дефинисане монофилетске линије. Поред тога, уочено присуство популационе структурираности унутар врста са широм дистрибуцијом би, у духу интегративног приступа, требало истражити применом морфометријских карактера, уз додатне анализе добијених *SNP* података. Наиме, иако је у оквиру овог истраживања показана монофилија врста *M. ruficornis* групе, поставља се питање да ли уочена структурираност потенцијално указује на присуство комплекса криптичних таксона унутар јасно дефинисаних линија. Са тим у вези, истиче се потреба за даљим

испитивањима постојећег диверзитета, које би имало за циљ утврђивање линија са независним еволуционим током и пружање детаљнијег увида у разноврсност групе, чиме би се омогућило прецизније одређивање јединица конзервационог управљања.

Узимајући у обзир претходно наведено, ова дисертација је указала на велики значај *ddRAD-seq* методе, као молекуларног алата за одређивање генетичког диверзитета *Merodon ruficornis* групе врста. Како, према досадашњим сазнањима ово истраживање представља прву анализу геномских података добијених неком од *RAD-seq* метода у молекуларним студијама осолених мува, добијени резултати подржавају примену овог алата у расветљавању таксономских изазова и нелогичности унутар рода *Merodon*, као и код осталих представника фамилије Syrphidae.

6.2. Диверзификација линија унутар *Merodon ruficornis* групе врста као резултат климатских промена током Плеистоцена

Претходним истраживањем еколошких ниша *M. ruficornis* групе утврђено је да су различити климатски и други средински услови, као и биогеографски процеси из прошлости имали важну улогу у обликовању обрасца дистрибуције, али и у процесу диверзификације врста из ове групе (Аџански и сар., 2017). Подручја распрострањења врста из *M. ruficornis* групе претежно обухватају регион северног и источног Медитерана (Vujić et al., 2012), за који је познато да је током историје пролазио кроз широк спектар палеонтолошких и палеоклиматских промена, што се у значајној мери одразило на геоморфолошку и биолошку еволуцију унутар овог региона (Hughes и сар., 2010). Наиме, током лацијалних периода у Плеистоцену је подручје Централне Европе, услед преовлађавања изузетно хладне и суве климе, представљало сувише непогодно окружење за највећи број врста, те су оне постепено мигрирале ка југу Европе (Hewitt, 2011). Због своје повољне климе, медитеранска полуострва су имала важну улогу као уточишта и природне баријере за ширење и колонизацију врста током ових лацијација. Додатно је утврђено да је Мала Азија представљала један од најзначајнијих биодиверзитетских рефугијума током хладних циклуса епохе Плеистоцена. Са друге стране, топли интергацијални периоди омогућавали су ширење врста назад према северу, односно ка подручјима Централне и Северне Европе (Taberlet и сар., 1998). Сходно томе, услед циркуларних климатских и тополошких

промена током глацијалних и интергацијалних периода ове епохе, врсте су прошле кроз велики број циклуса сужавања и експанзије ареала, што је имало снажан утицај на дистрибуцију ових врста и водило је ка потенцијалној диференцијацији између популација (Hewitt, 2011). Према времену раздвајања, које је утврђено применом методе коалесценције на сету митохондријских маркера, откривено је да се диверзификација линија унутар *M. ruficornis* групе врста одвијала у периоду Плеистоцена. Недавним истраживањима је установљено да су промене у дистрибуцији током ове епохе утицале и на еволуциони образац других врста осоликних мува и њихове диференцијације која је, услед глацијалних и интергацијалних циклуса, настала као резултат поновљања периода изолације између популација (Šašić и сар., 2016; Ačanski и сар., 2017; Chroni и сар., 2019; Radenković и сар., 2020). Ačanski и сар. (2017) су претпоставили да су врсте из *M. ruficornis* групе током своје еволуционе историје прошле кроз наизменичне периоде изолације и поновног повезивања, који су у вези са климатским променама плеистоценске епохе. Ова претпоставка је у корелацији са резултатима добијеним методом коалесценције, који указују да су циклуси сужавања и експанзије ареала током Плеистоцена највероватније имали значајну улогу у обликовању биолошке разноврсности и диверзификацији линија унутар *M. ruficornis* групе врста. Наиме, на основу анализе митохондријских гена откривено је да су циклуси глацијације и интергацијације имали снажан утицај, не само на раздвајање врста, већ и на процес интраспецијске диференцијације између различитих популација унутар врста. Тако је забележено да се раздвајање између *M. trebevicensis* популације са Анадолијског полуострва у односу на балканске јединке исте врсте пореклом са Дубашнице, највероватније одиграло у периоду између Миндел и Рис глацијалних циклуса, односно током Велике Миндел — Рис интергацијације (Milankovitch, 1941; Kukla, 2005). Додатно је током истог интергацијалног периода дошло и до диверзификације између анадолијске популације *M. loewi* пореклом из Фетија и линије која обухвата балканске представнике врста *M. armipes* и *M. loewi*, као и до раздвајања француских јединки *M. ruficornis* врсте у односу на популације са Балкана и из Украјине. С друге стране, балканска популација врсте *M. auripes* се током Калабријске етапе раног Плеистоцена, односно пре отприлике 918 хиљада година одвојила од линије која обухвата представнике *M. auripes* са Анадолијског полуострва + *M. acutus* + *M. ilgazenze* + *M. ovaloides* + *M. fulavitarsis* + *M. papillus* + *M. loewi* + *M. armipes* (Cita и сар., 2008). Како су врсте *M. armipes*, *M. auripes*, *M. loewi* и *M. trebevicensis* претежно распрострањене у северном и источном Медитерану, њихова

станишта су пролазила кроз наизменични период фрагментације изазван климатским променама током епохе Плеистоцена. Наиме, врсту *M. armipes*, заједно са *M. trebevicensis* и *M. auripes*, карактерише широка распрострањеност на територији Балкана и шире, док су на Анадолијском полуострву представљене са свега неколико појединачних популација. Са тим у вези, постоји могућност да су током глацијалног периода, неке од балканских популација мигрирале на исток и колонизовале Анадолијско полуострво и подручје северно од Црног мора, што је последично имало велики утицај на диференцијацију насталу независном еволуцијом географски и репродуктивно изолованих популација. Поред тога, ниска стопа митохондријске дивергенције јединки *M. armipes* из Италије и Западне Европе, у односу на балканске и анадолијске представнике врсте *M. trebevicensis*, може представљати резултат размене генетичког материјала између одређених предачких популација које су насељавале исте локалитете унутар Балканског полуострва, при чему је овај процес морао претходити ширењу ареала врсте *M. armipes* ка Централној и Западној Европи током интергацијације, односно мигрирању балканских представника *M. trebevicensis* ка Анадолијском полуострву у глацијалном периоду. Насупрот томе, врста *M. loewi* се највероватније проширила из Мале Азије, с обзиром да претежно насељава Анадолијско полуострво и југ Балкана, док се северније јавља само у изолованим рефугијумима, као што је популација из Ђердапске клисуре, при чему се претпоставља да су јединке *M. loewi* дуж свог ареала размењивале генетички материјал са популацијама врста *M. armipes* и *M. papillus*. Како је претходним истраживањем утврђена значајна улога еколошких процеса у дистрибуцији и диверзификацији *M. ruficornis* групе, може се претпоставити да су срединске варијабле у додатној мери обликовале генетички диверзитет врста из ове групе.

6.3. Присуство *Wolbachia* бактеријског ендосимбионта код врста из *Merodon ruficornis* групе врста

Резултати тестирања на присуство ентомофилског симбионта су указали на висок ниво заступљености *Wolbachia* инфекције у *Merodon ruficornis* групи осолоких мува. Наиме, присуство овог ендосимбионта је на основу секвенце бактеријског 16S рРНК гена, забележено код готово свих испитиваних врста *M. ruficornis* групе, независно од локалитета са ког потичу. Инфекција није детектована једино код врсте

M. hoplitis, што је интересантан податак уколико се у обзир узме да ова врста заједно са зараженим представником врсте *M. armipes* насељава исти локалитет на планини Орјен. Поред тога, сагледавањем конструисаних стабала, односно генеалогije *COI* гена код *M. ruficornis* групе, откривено је да су бактеријом из рода *Wolbachia* заражени представници сваке од анализом обухваћених клада (осим оне која одговара врсти *M. hoplitis*), те да се инциденца, у случају ове групе, не може довести у везу са дистрибуцијом, као ни са варијантом мтДНК која је присутна код јединки заражених врста.

Студијом из 2019. године, Šašić Zorić и сар. су код 50 од 52 тестиране *Merodon* врсте открили присуство *Wolbachia* унутарћелијског симбионта, указујући тиме да стопа инфицираности осоликих мува из овог рода износи 96%, што је знатно више у односу на инциденцу у вредности од 19% до 76%, колико је претходним истраживањима забележено да достиже код зглавкара (Јеуаракaш и Ноу 2000; Werren и Windsor 2000; Werren и сар., 2008; Simões и сар., 2011; Zug и Hammerstein 2012; Weinert и сар., 2015). Висок ниво инциденце заражених врста осоликих мува из *Merodon* рода је додатно подржан, како резултатима ове дисертације, тако и испитивањем *Merodon aureus* групе врста, код које је присуство инфекције детектовано код чак 97,7% испитиваних узорака (Šašić Zorić, 2018), при чему ове налазе треба узети са дозом резерве, будући да су за неке врсте у анализу укључене само једна до две јединке, те резултат може одступати од стварне инциденце. Међутим, Hilgenboecker и сар. (2008) су анализом различитих представника Arthropoda утврдили да је учесталост заражених јединки унутар једне врсте обично или изузетно висока (>90%) или веома ниска (<10%), што је у складу са резултатима ове дисертације, на основу којих је процењено да се стопа инфекције код врста са већим бројем тестираних јединки, као што су *M. armipes*, *M. loewi* и *M. trebevicensis*, креће у опсегу од 91% до 100%, док је одсуство *Wolbachia* ендосимбионта, као што је то већ напоменуто, уочено само код једног таксона из *M. ruficornis* групе, односно код *M. hoplitis* врсте.

Род *Wolbachia* је представљен унутарћелијским α протео бактеријама различитих врста Arthropoda и Nematoda, за које је показано да, поред тога што потенцијално условљавају ширење одређених варијанти мтДНК, могу на различите начине утицати на репродуктивну способност домаћина (Werren и сар., 2008; Engelstädter и Hurst, 2009; Zug и Hammerstein 2012). Наиме, показано је да присуство

бактерије из рода *Wolbachia* код инсеката, доводи до потенцијалног развоја репродуктивне баријере, која се може манифестовати у виду унидирекционе или бидирекционе цитоплазматске инкомпатибилности. Присуство инфекције се по правилу преноси путем јајне ћелије, односно наслеђује по материнској линији, при чему инфицирани мужјаци често имају модификоване сперматозоиде због којих могу оплодити само јајне ћелије инфицираних женки, с обзиром да оне, за разлику од незаражених, поседују својеврсни механизмом спасавања заражених сперматозоида, захваљујући ком долази до развоја зигота. Овај феномен се назива унидирекциона цитоплазматска инкомпатибилност, док са друге стране бидирекциона настаје када два, или више различитих бактеријских сојева инфицира различите јединке, и/или популације, што потенцијално узрокује стварање баријере у протоку гена унутар исте врсте, мада је још увек остало неразјашњено да ли овај механизам може довести до специјације (Werren и сар., 2008). Утицај *Wolbachia* унутарћелијског ендосимбионта на дивергенцију митохондријског генома је свакако веома разноврстан и може проузроковати смањење диверзитета, услед инфекције једним сојем који тежи фиксирању одређених мтДНК хаплотипова у популацији; затим повећање диверзитета насталог као резултат вишеструких инфекција; промене просторног обрасца варијабилности у случају када су различите популације инфициране различитим бактеријским сојевима; као и парафилију и полифилију мтДНК, која се може развити услед хоризонталног трансфера између јединки различитих врста (Hurst и Jiggins, 2005).

Испитивањем 1100 различитих врста зглавкара, *Bailly-Bechet* и сар. (2017) су код већине открили релативно скору инфекцију бактеријом из рода *Wolbachia*, при чему су се догађаји стицања и губитака овог унутарћелијског симбионта углавном десили у последњих милион година, премда неки случајеви указују на могућност дугорочније инфекције. Међутим, аутори сматрају како се већина скоријих догађаја највероватније може приписати варијацијама на индивидуалном нивоу, као што су губитак ендосимбионта услед несавршености матерналног преношења, или инфекција појединачних јединки која се у највећем броју случајева не прошири на нивоу популације. Са друге стране, узимајући у обзир догађаје на популационом нивоу, долази се до процене да неинфициране линије бивају заражене на приближно сваких 9,3 милиона година, док се губитак *Wolbachia* ендосимбионта код инфицираних линија дешава у размаку од 7 милиона година (*Bailly-Bechet* и сар. 2017). Стога, под

претпоставком оваквог сценарија, постоји могућност да је динамика стицања и губитка *Wolbachia* инфекције обликовала мтДНК генеологију врста (Šašić Zorić и сар., 2019). Висок ниво заступљености заражених врста *M. ruficornis* групе, може указивати на ранију инфекцију ендосимбионтом из рода *Wolbachia*, која се највероватније одиграла пре диверзификације и раздвајања линија у оквиру ове групе, при чему је до потенцијалног губитка инфекције код врсте *M. hoplitis* могло доћи током независне еволуције овог таксона. Са друге стране, узрок високе инциденце код ове групе може се тражити и у потенцијалној склоности бактерије ка домаћину из *ruficornis* групе осоликих мува. Резултатима молекуларне анализе је утврђено да *Wolbachia* ендосимбионти свих испитиваних јединки из *M. ruficornis* групе деле идентичну секвенцу 16S рРНК гена, независно од таксономске припадности и/или локалитета који домаћин насељава, што потенцијално може бити сигнал инфекције која се одиграла у ранијој историји ове групе. Међутим, овакав закључак није могуће донети само на основу варијабилности 16S рРНК бактеријског гена, те је у анализу диверзитета сојева присутних код *M. ruficornis* групе, неопходно уврстити додатне маркере, као што је ген за површински протеин бактерије *Wolbachia* (енгл. *Wolbachia surface protein gene*, *wsp gene*). Поред тога, поређењем добијеног хаплотипа са *NCBI* базом нуклеотидних секвенци применом *BLAST* софтверског пакета, откривено је да су врсте *M. ruficornis* групе заражене *Wolbachia* супергрупом А, чије је присуство претходним испитивањима већ забележено код представника *Merodon* рода, указујући тиме на подложност *Merodon* врста инфекцији сојевима из ове супергрупе (Šašić Zorić, 2018; Šašić Zorić и сар., 2019). Узимајући у обзир високу стопу инфекције код врста *M. ruficornis* групе, као и потенцијалну улогу рода *Wolbachia* у обликовању диверзитета домаћина, поставља се питање да ли је, и у коликој мери бактеријска инфекција имала утицај на обликовање генеологије и обрасца мтДНК диверзитета, посебно на присуство дељених хаплотипова, као и учесталост парафилије и полифилије у еволуцији *M. ruficornis* врста. Међутим, детаљније испитивање коеволуције *Wolbachia* унутарћелијског симбионта и мтДНК *M. ruficornis* групе захтева анализу додатних јединки, али и маркера пореклом, како са бактеријског, тако и са митохондријског генома.

6.4. Утицај срединских фактора у обликовању генетичког диверзитета *Merodon ruficornis* групе врста

Разумевање утицаја срединских карактеристика на креирање образаца генетичког диверзитета је од есенцијалне важности за разумевање еволуционе динамике, као и за правилно утврђивање јединица конзервационог управљања. Препознато је да интеракције између организама и њиховог окружења имају кључну улогу у обликовању просторне структуре врста. Са тим у вези, адаптивна варијабилност настала услед хетерогености срединских услова, може допринети процесу генетичке диференцијације независно од географске удаљености, чак и када се проток гена одвија у одређеној мери (Wang и Bradburd, 2014).

Премда је митохондријском геному приписивана неутрална еволуција, селекција на нивоу митохондријских гена који су укључени у важне метаболичке путеве може довести до популационе дивергенције настале као резултат другачијих енергетских захтева при различитим условима средине. Претходним студијама је указано да варијабилност митохондријских гена укључених у процесе оксидативне фосфорилације може бити последица оптимизације ефикасности ћелијског дисања на услове спољашње средине, тако да географска дистрибуција митохондријских варијанти ОХРНOS система у одређеној мери може зависити од срединских карактеристика станишта (Morales и сар., 2015; Zeng и сар., 2020; Baltazar-Soares и сар., 2021; Zeng и сар., 2023). Према томе, сагледавање улоге срединских карактеристика је од велике важности за свеобухватно разумевање варијабилности ОХРНOS гена.

Међутим, утицај срединских услова на обликовање генетичког диверзитета осоликних мува рода *Merodon* представља слабо истражену област, при чему је у досадашњим студијама забележено само једно истраживање на ову тему. Наиме, Gorše и сар. су 2022. године открили да варијација 7 климатских и геопросторних варијабли у великој мери објашњава уочени образац просторне дистрибуције 5' *COI* хаплотипова код широко распрострањене врсте *Merodon aerarius*, указујући тиме на снажан утицај фактора животне средине у диверзификацији ове врсте. Како продукти испитиваних митохондријских *COI* и *Cyt b* гена представљају есенцијалне компоненте ћелијског дисања и енергетског метаболизма, приступљено је сагледавању утицаја климатских и геопросторних фактора на дистрибуцију хаплотипова ових гена, а сходно томе и на

уочени образац митохондријског диверзитета врста *M. armipes*, *M. loewi* и *M. papillus*, за које је поред одсуства монофилетске еволуције мтДНК, показано да деле заједничке секвенце митохондријских маркера. Сагледавањем добијених резултата је откривено да у обликовању дистрибуције испитиваних мтДНК варијанти, поред геопросторних карактеристика у виду географске ширине и дужине, значајан допринос показују и различите биоклиматске варијације, које се претежно заснивају на преципитационим режимима средине. Наиме, забележено је да варијације у стопи преципитације током месеца и квартала са најмањом количином падавина, затим сезонска количина падавина, као и ниво преципитације током најсувљег месеца, имају статистички значајну улогу у креирању митохондријског диверзитета, израженог у виду просторне варијабилности у фреквенцијама *COI* и *Cyt b* хаплотипова. Посебан утицај на обликовање дистрибуције мтДНК варијанти забележен је на основу срединских разлика у стопи преципитације током месеца са најмањом количином падавина. Међутим, како су адултне јединке испитиваних врста активне у периоду од априла до краја јуна (Speight, 2020), уочени образац просторног диверзитета митохондријских варијанти OXPNS гена се може интерпретирати у светлу оптимизације ћелијског дисања и енергетског метаболизма да одговоре на енергетске захтеве неопходне за правилно одвијање процеса током преимагиналних фаза развића. Са друге стране, варијација у средњој температури квартала са највећом количином падавина се издваја као температурни режим са највећим доприносом у обликовању обрасца диверзитета испитиваних митохондријских гена. Наиме, врсте *M. armipes* и *M. loewi* представљају таксоне са широм просторном дистрибуцијом, које поред јадранског и медитеранског приобаља, претежно настањују локалитете са континенталном климом, за коју је карактеристично да период са највећом количином падавина обухвата топлију половину године, односно мај и јун. С обзиром да јединке ових врста лете у периоду маја и јуна, уочени сигнал се може довести у везу са активношћу адултних јединки у континенталним подручјима, као и са оптицимазицијом енергетског метаболизма на различите температурне режиме. Узимајући у обзир све претходно наведено, може се установити да су средински услови имали улогу у обликовању просторне дистрибуције хаплотипова, те да се уочени образац митохондријског диверзитета у одређеној мери може посматрати кроз призму молекуларних адаптација на хетерогеност услова средине.

Поред тога, сагледавањем *Gradient forest* модела заснованих на *SNP* подацима, откривена је варијација у утицају срединских карактеристика на обликовање генетичког диверзитета различитих врста *M. ruficornis* групе. Наиме, забележено је да геопросторне варијабле, представљене географском ширином и дужином, у највећој мери доприносе уоченом обрасцу фреквенције алела унутар врсте *M. armipes*, што се може објаснити дистрибуцијом ове најшире распрострањене врсте *M. ruficornis* групе, која насељава просторе од северноисточне Француске на западу, преко Централне Европе и Балкана, до Мале Азије на истоку (Speight, 2020). Са тим у вези, претпоставља се да смањени проток гена између географски удаљених популација јесте један од водећих покретача генетичке дивергенције, односно процеса диверзификације унутар ове врсте. Насупрот томе, генетички диверзитет врсте *M. auripes* је у највећој мери објашњен варијабилношћу биоклиматских фактора који су представљени средњом месечном температуром и варијацијом у виду температурне сезоналности, заједно са сезонском преципитацијом, као и нивоима преципитације током најтоплијег, али и најсувљег квартала и месеца. Уочени тренд је у сагласности са резултатима претходно спроведеног испитивања еколошких ниша *M. ruficornis* групе, на основу којих је откривено да дистрибуција врсте *M. auripes* имплицира широку прилагодљивост на флукуације у количини падавина током најсувљег и најтоплијег квартала у години (Аџански и сар., 2017). Хетерогеност климе током најсувљег и најтоплијег периода се такође налазе међу срединским варијаблама које у највећој мери описују генетичку структуру *M. loewi*, што се слично као и са диверзитетом испитиваних митохондријских гена не може довести у корелацију са активношћу адултних јединки, за које је забележено да лете од априла до почетка јуна (Speight, 2020), Са тим у вези, одговор вероватније треба тражити на нивоу молекуларних механизма који омогућавају прилагодљивост климатским условима током преимагиналних фаза развића. Међутим, поред биоклиматских услова, географска дужина се показала као најважнији фактор обликовања обрасца генетичке варијабилности унутар врсте *M. loewi*. Наиме, дистрибуција ове врсте обухвата велик распон географске дужине, те су јединке *M. loewi* забележене на просторима листопадних и зимзелених шума од Апенинског полуострва, до Турске и Јерменије (Speight, 2020), при чему је испитивани материјал прикупљан од Балкана на западу, затим преко острва Лезбоса и западног приобаља Турске (Фетије, Испарта), па све до планине Илгас која се налази на северу централног дела Анатолијског полуострва. Утицај географске удаљености на дивергенцију линија унутар врсте *M. loewi*,

забележен је и на основу анализе филогенетских односа унутар *M. ruficornis* групе, чијом проценом је уочено присуство филогеографске структуре изражене у виду заједничког груписања јединки *M. loewi* пореклом са географски блиских локалитета. Интересантан податак је да се међу факторима са највећим доприносом нашла још једна геопросторна варијабла, односно надморска висина, која се доводи у везу са чињеницом да дистрибуција *M. loewi* обухвата највећи висински распон у односу на све остале врсте из групе. Стога се може претпоставити да је адаптабилност на различите климатске режиме омогућила овој врсти насељавање станишта која се налазе на нивоу мора, али и на висини изнад 2500 метара надморске висине. Поред тога, добијени резултати су открили приближан утицај већине срединских карактеристика на генетичку диверзификацију врсте *M. trebevicensis*, при чему је уочено да генетичка структура најмање зависи од варијације у клими током најхладнијег периода, као и периода са највећом количином падавина. Са друге стране, показано је да геопросторне варијабле, односно географска ширина и дужина, у највећој мери доприносе обрасцу генетичког диверзитета *M. trebevicensis*, што се може интерпретирати процесом дивергенције који се одвија услед смањеног протока гена између удаљених популација ове врсте.

Како би се стекао свеобухватнији увид у механизме адаптација, истиче се потреба за разумевањем молекуларне основе одговора на хетерогеност средине, при чему је примена маркера различитих особина под утицајем селекције од изузетне важности за сагледавање природе процеса који имају улогу у обликовању генетичког диверзитета врста из *M. ruficornis* групе. Са тим у вези, у испитивање генерисаних *ddRAD* секвенци је неопходно увести тумачење секвенци у односу на референтни геном, чиме би се омогућило дефинисање геномског положаја, као и улоге региона који се налазе под утицајем различитих еволуционих процеса. Одређивањем карактеристика генетичких маркера, на основу којих је могуће идентификовати припадност популацији, добија се темељнији увид у природу еволуционих процеса који воде процесу диверзификације и потенцијалне специјације унутар *M. ruficornis* групе. Према томе, наредни корак би требао обухватити сагледавање функционалног генетичког диверзитета у циљу детаљнијег разумевања сигнала адаптација осоликних мува, као и физиологије самог одговора, чиме би се стекла темељна основа за развој правилних мера и стратегија очувања врста из *M. ruficornis* групе осоликних мува.

7. Закључак

Молекуларни диверзитет *Merodon ruficornis* групе процењен је применом постојећих и развојем нових молекуларних алата од значаја за утврђивање таксономских граница и процену филогенетских односа између испитиваних врста. Анализирана је варијабилност одабраног сета сачињеног од пет генетичких региона, од којих се три налазе унутар митохондријског генома (оба региона *COI* гена (3' и 5' крај), заједно са регионом гена за цитохром б (*Cyt b*)), док су два представљена секвенцама једарне ДНК (*D2-3* експанзивни регион једарног *28S* рРНК гена, као и унутрашњи транскрибујући спејсер 2 (*ITS2*)). Поред тога, у испитивање генетичког диверзитета је уведена примена *ddRAD-seq* методе, пружајући тиме увид у велики број молекуларних маркера који осликавају различите делове генома.

- Добијени резултати су указали на ограниченост митохондријских маркера у утврђивању граница између свих врста у оквиру *M. ruficornis* групе, потврдивши на тај начин умањену поузданост приступа заснованог на примени само једног гена митохондријског генома. Међутим, узимајући у обзир да су региони мтДНК омогућили идентификацију већине таксона, може се закључити да су се анализирани митохондријски гени у одређеној мери показали као користан алат за испитивање таксономских граница унутар ове групе.
- Испитивани једарни регион *28S* рРНК гена пружио је додатну подршку у дефинисању одређених врста, али и у откривању популационе структуре, посебно када се уз варијабилност нуклеотидне секвенце користе и подаци засновани на инсерцијама и делецијама. Премда *28S* рРНК ген, услед ниже стопе еволуционих промена у поређењу са анализираним протеин кодирајућим генима и регионом спејсера, показује ограничену информативност за утврђивање граница врста, овај једарни маркер у комбинацији са другим генетичким регионима, може бити од значаја приликом процене филогенетских односа унутар *M. ruficornis* групе.
- Резултати овог истраживања су утврдили да варијабилност секвенце *ITS2* региона са бинарно записаним инделима представља изузетно моћан алат, који би требало узети у обзир као додатни карактер приликом идентификације таксона из *M. ruficornis* групе путем ДНК баркодинга. Према томе, истиче се

важност примене овог једарног маркера приликом одређивања таксономске припадности у случајевима када су женке различитих врста морфолошки сличне и/или немају дијагностички препознатљиве карактере.

- Узимајући у обзир изузетан значај инсерција и делеција као молекуларног сигнала у таксономији *M. ruficornis* групе, предлаже се евалуација и употреба индела као додатног алата у раздвајању врста и разјашњавању таксономије унутар рода *Merodon*.
- Примена широко дистрибуираних геномских података добијених *ddRAD-seq* методом, омогућила је успешно раздвајање свих испитиваних врста из *M. ruficornis* групе, при чему је додатно указала на присуство интраспецијске диференцијације код врста са широм дистрибуцијом. Представљајући прву примену неке од *RAD-seq* метода у молекуларним студијама осолених мува, добијени резултати чврсто подржавају имплементацију овог алата приликом расветљавања таксономских изазова и нелогичности, како унутар рода *Merodon*, тако и код осталих представника фамилије Syrphidae.
- Анализе засноване на нуклеотидним секвенцама митохондријских гена, као и на комбинованом сету података који обухвата укупно пет митохондријских и једарних региона, нису пружиле јасан увид у филогенију *M. ruficornis* групе, указавши притом на учесталост полифилије и парафилије врста.
- Насупрот томе, генерисањем великог броја генетичких маркера који у виду *SNP* података осликавају различите делове генома, *ddRAD-seq* метода је успешно разрешила еволуционе односе унутар *M. ruficornis* групе, потврдивши значај овог приступа, не само у таксономским студијама, већ и у процени филогенетских односа између блиско сродних немодел врста.
- Према процени времена развајања, уочено је да су промене у дистрибуцији врста које су се одвијале услед драстичних измена климатских режима током плеистоценске епохе, највероватније имале значајну улогу у обликовању биолошке разноврсности и диверзификацији линија унутар *M. ruficornis* групе врста. У прилог томе иду резултати испитивања улоге срединских фактора на генетички диверзитет *M. ruficornis* групе, на основу којих је утврђен значајан допринос геопросторних и биоклиматских карактеристика у обликовању

обрасца дистрибуције хаплотипова испитиваних митохондријских гена, чији продукти представљају есенцијалне компоненте у процесу ћелијског дисања и енергетског метаболизма. Поред тога, испитивањем генерисаних *SNP* података, откривена је варијација у доприносу различитих срединских карактеристика на образац генетичког диверзитета код врста *M. ruficornis* групе, указујући тиме да различити механизми имају улогу у креирању диверзификације унутар ових блиско сродних врста.

- Додатно је у оквиру овог истраживања код свих испитиваних врста *M. ruficornis* групе, изузев *M. hoplitis*, откривено присуство инфекције унутарћелијском бактеријом из рода *Wolbachia*, при чему је анализом бактеријских секвенци 16S рРНК гена утврђено да су јединке заражене *Wolbachia* супергрупом А.

Узимајући у обзир претходно наведено, може се закључити да таксономске и филогенетске нелогичности у митохондријском диверзитету *M. ruficornis* групе, највероватније представљају средински обликован сигнал инкорпорације митохондријског генома једне врсте у другу, поред чега постоји и могућност утицаја бактерије из рода *Wolbachia* на креирање уоченог обрасца у генеологији мтДНК. Међутим, на основу овог истраживања није могуће изнети закључке о улози *Wolbachia* ендосимбионта у еволуцији мтДНК код врста из *M. ruficornis* групе.

Резултати ове дисертације указују на важност примене молекуларних маркера смештених у различитим деловима генома, који пружају целовитији увид у процесе диференцијације и еволуциону историју групе. Омогућавајући јасно утврђивање таксономских граница и филогенетских односа, као и детаљније разумевање комплексности процеса специјације обликованог од стране различитих фактора, ова дисертација представља значајан допринос у процени свеукупне разноврсности осоликних мува. Са тим у вези, истиче се важност расветљавања молекуларног диверзитета као неопходне компоненте у праћењу и успостављању правилних мера и стратегија на пољу очувања биолошке разноврсности инсекатских опрашивача.

8. Литература

- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19(6), 716–723. <https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>
- Andersen, M. J., McCullough, J. M., Gyllenhaal, E. F., Mapel, X. M., Haryoko, T., Jønsson, K. A., & Joseph, L. (2021). Complex histories of gene flow and a mitochondrial capture event in a nonsister pair of birds. *Molecular Ecology*, 30(9), 2087-2103.
- Anderson, E. (1949) *Introgressive hybridization*. New York: Wiley and Sons.
- Anderson, E. and Hubricht, L. (1938) Hybridization in *Tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridization. *American Journal of Botany*, 25:396-402.
- Anderson, M., Gorley, R., & Clarke, K. (2008). *PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to software and statistical methods*. PRIMER-e.
- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 81-92.
- Andrić, A., Tubić, N.K., Đan, M., Vujić, A., Vidaković, D.O. (2017) Assessment of genetic diversity within the *Merodon ruficornis* species group (Diptera: Syrphidae) by RAPD analysis. *Archives of Biological Sciences*, 69(3): 553-560.
- Andrić, A., Šikoparija, B., Obreht, D., Djan, M., Preradović, J., Radenković, S., Pérez-Bañon, C. & Vujić, A., (2014). DNA barcoding applied: identifying the larva of *Merodon avidus* (Diptera: Syrphidae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, 54, 741-757.
- Aracil, A., Grković, A., Pérez-Bañón, C., Kočiš Tubić, N., Juan, A., Radenković, S., ... & Rojo, S. (2023). A new species of phytophagous flower fly (Diptera, Syrphidae), feeding on holoparasitic broomrape plants (Orobanchaceae) for the first time in Europe. *Arthropod-Plant Interactions*, 17(3), 401-418.
- Aracil, A., Ačanski, J., Pérez-Bañón, C., Šikoparija, B., Miličić, M., Campoy, A., ... & Rojo, S. (2022). Characterization of preimaginal developmental stages of two cryptic South African species of the *Merodon planifacies* complex (Diptera: Syrphidae: Eristalinae: Merodontini), with differentiation through morphometry analysis. *Arthropod Structure & Development*, 70, 101187.
- Astrin, J. J., Höfer, H., Spelda, J., Holstein, J., Bayer, S., Hendrich, L., ... & Muster, C. (2016). Towards a DNA barcode reference database for spiders and harvestmen of Germany. *PLoS one*, 11(9), e0162624.
- Ačanski, J., Miličić, M., Likov, L., Milić, D., Radenković, S., Vujić, A. (2017) Environmental niche divergence of species from *Merodon ruficornis* group (Diptera: Syrphidae). *Archives of Biological Sciences*, 69(2): 247-259.

- Baião, G. C., Schneider, D. I., Miller, W. J., & Klasson, L. (2023). Multiple introgressions shape mitochondrial evolutionary history in *Drosophila paulistorum* and the *Drosophila willistoni* group. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *180*, 107683.
- Ballard, J. W. O., & Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology*, *13*(4), 729-744.
- Baltazar-Soares, M., de Araújo Lima, A. R., & Silva, G. (2021). Targeted sequencing of mitochondrial genes reveals signatures of molecular adaptation in a nearly panmictic small pelagic fish species. *Genes*, *12*(1), 91.
- Bailly-Bechet, M., Martins-Simões, P., Szöllösi, G. J., Mialdea, G., Sagot, M. F., & Charlat, S. (2017). How long does *Wolbachia* remain on board? *Molecular Biology and Evolution*, *34*(5), 1183-1193.
- Bandelt, H., Forster, P. and Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *16*(1): 37-48. PopART (<http://popart.otago.ac.nz>)
- Bates, H.W. (1862) Contributions to an insect fauna of the Amazon valley (Lepidoptera: Heliconidae). *Transactions of the Linnean Society of London*, *23*: 495-556.
- Barkalov, A. V., & Ståhls, G. (2015). Descriptions of three new species of the genus *Cheilosia* Meigen from China (Diptera, Syrphidae). *Zootaxa*, *3972*(2), 280–290. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3972.2.8>
- Beebe, N. W., & Saul, A. (1995). Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *53*(5), 478–481. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.478>
- Beebe, N. W. (2018). DNA barcoding mosquitoes: advice for potential prospectors. *Parasitology*, *145*(5), 622-633.
- Belinky, F., Cohen, O., & Huchon, D. (2010). Large-scale parsimony analysis of metazoan indels in protein-coding genes. *Molecular Biology and Evolution*, *27*(2), 441–451. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp263>
- Belshaw, R., Lopez-Vaamonde, C., Degerli, N., & Quicke, D. L. (2001). Paraphyletic taxa and taxonomic chaining: Evaluating the classification of braconine wasps (Hymenoptera: Braconidae) using 28S D2–3 rDNA sequences and morphological characters. *Biological Journal of the Linnean Society*, *73*, 411–424. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2001.tb01370.x>
- Bonnet, T., Leblois, R., Rousset, F., & Crochet, P. A. (2017). A reassessment of explanations for discordant introgressions of mitochondrial and nuclear genomes. *Evolution*, *71*(9), 2140-2158.
- Bonvicino, C. R., Casado, F., & Weksler, M. (2014). A new species of *Cerradomys* (Mammalia: Rodentia: Cricetidae) from Central Brazil, with remarks on the taxonomy of the genus. *Zoologia (Curitiba)*, *31*, 525-540.
- Borchsenius, F. (2009). *FastGap 1.2*. Department of Biosciences, Aarhus University, Denmark. Retrieved June 8, 2020, from http://www.aubot.dk/FastGap_home.htm

- Boutte, J., Fishbein, M., Liston, A., & Straub, S. C. (2019). NGSIndel Coder: A pipeline to code indel characters in phylogenomic data with an example of its application in milkweeds (*Asclepias*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 139, 106534. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106534>
- Brower, A. V. (1994). Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(14), 6491-6495. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6491>
- Bruzzese, D. J., Schuler, H., Wolfe, T. M., Glover, M. M., Mastroni, J. V., Doellman, M. M., ... & Feder, J. L. (2022). Testing the potential contribution of *Wolbachia* to speciation when cytoplasmic incompatibility becomes associated with host-related reproductive isolation. *Molecular Ecology*, 31(10), 2935-2950.
- Burton, R. S. (2022). The role of mitonuclear incompatibilities in allopatric speciation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(2), 103.
- Cariou, M., Duret, L., & Charlat, S. (2013). Is RAD-seq suitable for phylogenetic inference? An in silico assessment and optimization. *Ecology and evolution*, 3(4), 846-852.
- Caraballo, D. A., Montani, M. E., Martínez, L. M., Antoniazzi, L. R., Sambrana, T. C., Fernández, C., ... & Colombo, V. C. (2020). Heterogeneous taxonomic resolution of cytochrome b gene identification of bats from Argentina: Implications for field studies. *PLoS one*, 15(12), e0244750.
- Chen, H., Rangasamy, M., Tan, S.Y., Wang, H., Siegfried, B.D. (2010) Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS one*, 5: e11963.
- Chifman, J., & Kubatko, L. (2014). Quartet inference from SNP data under the coalescent model. *Bioinformatics*, 30(23), 3317-3324.
- Chroni, A., Stefanović, M., Djan, M., Vujić, A., Šašić Zorić, L., Kočiš Tubić, N., & Petanidou, T. (2019). Connecting the dots: Bridging genetic and spatial differentiation of the genus *Eumerus* (Diptera: Syrphidae) in the Mediterranean Basin and Balkans. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 57(4), 822–839. <https://doi.org/10.1111/jzs.12300>
- Chou, J., Gupta, A., Yaduvanshi, S., Davidson, R., Nute, M., Mirarab, S., & Warnow, T. (2015). A comparative study of SVDquartets and other coalescent-based species tree estimation methods. *BMC genomics*, 16(10), 1-11.
- Chroni, A., Djan, M., Vidaković, D. O., Petanidou, T., & Vujić, A. (2017). Molecular species delimitation in the genus *Eumerus* (Diptera: Syrphidae). *Bulletin of Entomological Research*, 107(1), 126–138. <https://doi.org/10.1017/S0007485316000729>
- Chroni, A., Grković, A., Ačanski, J., Vujić, A., Radenković, S., Veličković, N., Djan, M. & Petanidou, T. (2018). Disentangling a cryptic species complex and defining new species within the *Eumerus minotaurus* group (Diptera: Syrphidae), based on integrative taxonomy and Aegean palaeogeography. *Contributions to Zoology*, 87(4), 197–225. <https://doi.org/10.1163/18759866-08704001>
- Clarke, K. R., & Gorley, R. N. (2015). Getting started with PRIMER v7. *PRIMER-E: Plymouth, Plymouth Marine Laboratory*, 20(1).

- Cita, M. B., Capraro, L., Ciaranfi, N., Di Stefano, E., Lirer, F., Maiorano, P., Rio, D., Sprovieri, R., Stefanelli, S. & Vai, G. B. (2008). The Calabrian stage redefined. *Episodes*, 31(4), 408–419. <https://doi.org/10.18814/epiiu.gs/2008/v31i4/006>
- Cognato, A.I. (2006) Standard percent DNA sequence difference for insects does not predict species boundaries. *Journal of Economic Entomology*, 99(4): 1037-1045.
- Collins, R.A. and Cruickshank, R.H. (2012) The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 13(6): 969-975.
- Comito, R., Darbyshire, I., Kiel, C., McDade, L., & Fisher, A. E. (2022). A RADseq phylogeny of *Barleria* (Acanthaceae) resolves fine-scale relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 169, 107428.
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., ... & 1000 Genomes Project Analysis Group. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156-2158.
- Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M., & Blaxter, M. L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 12(7), 499-510.
- DeRaad, D. A., McCullough, J. M., DeCicco, L. H., Hime, P. M., Joseph, L., Andersen, M. J., & Moyle, R. G. (2023). Mitonuclear discordance results from incomplete lineage sorting, with no detectable evidence for gene flow, in a rapid radiation of *Todiramphus* kingfishers. *Molecular Ecology*, 32(17), 4844-4862.
- Dianat, M., Voet, I., Ortiz, D., de Bellocq, J. G., Cuypers, L. N., Kryštufek, B., ... & Konečný, A. (2023). Cryptic diversity of *Crocidura* shrews in the savannahs of Eastern and Southern Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 180, 107708.
- Dincă, V., Lee, K. M., Vila, R., & Mutanen, M. (2019). The conundrum of species delimitation: a genomic perspective on a mitogenetically super-variable butterfly. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1911), 20191311.
- Dincă, V., Zakharov, E. V., Hebert, P. D., & Vila, R. (2011). Complete DNA barcode reference library for a country's butterfly fauna reveals high performance for temperate Europe. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1704), 347-355.
- Dong, X., Yi, W., Zheng, C., Zhu, X., Wang, S., Xue, H., ... & Bu, W. (2022). Species delimitation of rice seed bugs complex: Insights from mitochondrial genomes and ddRAD-seq data. *Zoologica Scripta*, 51(2), 185-198.
- Doyle, T., Hawkes, W.L., Massy, R., Powney, G.D., Menz, M.H. and Wotton, K.R. (2020) Pollination by hoverflies in the Anthropocene. *Proceedings of the Royal Society B*, 287(1927): 20200508.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*, 29(8), 1969–1973. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
- Dvoyashov, I. A., Bodrov, S. Y., Mamaev, N. V., Glagoleva, E. S., & Abramson, N. I. (2023). Inferring phylogenetic structure, taxa hybridization, and divergence times within rock voles of subgenus *Aschizomys* (Cricetidae: *Alticola*) using quaddRAD sequencing and a cytb dataset. *Ecology and Evolution*, 13(12), e10742.

- Dupuis, J. R., Peigler, R. S., Geib, S. M., & Rubinoff, D. (2018). Phylogenomics supports incongruence between ecological specialization and taxonomy in a charismatic clade of buck moths. *Molecular ecology*, 27(22), 4417-4429.
- Dan, M., Ståhls, G., Veličković, N., Ačanski, J., Vidaković, D. O., Rojo, S., ... & Vujić, A. (2020). The *Merodon planifacies* subgroup (Diptera, Syrphidae): Congruence of molecular and morphometric evidences reveal new taxa in Drakensberg mountains valleys (Republic of South Africa). *Zoologischer Anzeiger*, 287, 105-120.
- Eaton, D. A., Hipp, A. L., González-Rodríguez, A., & Cavender-Bares, J. (2015). Historical introgression among the American live oaks and the comparative nature of tests for introgression. *Evolution*, 69(10), 2587-2601.
- Eaton, D. A., & Overcast, I. (2020). ipyrad: Interactive assembly and analysis of RADseq datasets. *Bioinformatics*, 36(8), 2592-2594.
- Ebel, E. R., DaCosta, J. M., Sorenson, M. D., Hill, R. I., Briscoe, A. D., Willmott, K. R., & Mullen, S. P. (2015). Rapid diversification associated with ecological specialization in Neotropical *Adelpha* butterflies. *Molecular ecology*, 24(10), 2392-2405.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.
- Edmunds, M. (2008) Hoverflies: the garden mimics. *Biologist* 55(4): 202-207.
- Edmunds, M., Reader, T. (2014). Evidence for Batesian mimicry in a polymorphic hoverfly. *Evolution*, 68(3), 827-839.
- Ellis, N., Smith, S. J., & Pitcher, C. R. (2012). Gradient forests: Calculating importance gradients on physical predictors. *Ecology*, 93, 156–168.
- Engelstädter, J., & Hurst, G. D. (2009). The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 127-149.
- Firreno Jr, T. J., O'Neill, J. R., Portik, D. M., Emery, A. H., Townsend, J. H., & Fujita, M. K. (2020). Finding complexity in complexes: assessing the causes of mitonuclear discordance in a problematic species complex of Mesoamerican toads. *Molecular ecology*, 29(18), 3543-3559.
- Fitzpatrick, M. C., & Keller, S. R. (2015). Ecological genomics meets community-level modelling of biodiversity: Mapping the genomic landscape of current and future environmental adaptation. *Ecology Letters*, 18, 1–16.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Francuski, L., Ludoški, J., Vujić, A., & Milankov, V. (2009). Wing geometric morphometric inferences on species delimitation and intraspecific divergent units in the *Merodon ruficornis* group (Diptera, Syrphidae) from the Balkan Peninsula. *Zoological science*, 26(4), 301–308. <https://doi.org/10.2108/zsj.26.301>
- Funk, D. J., & Omland, K. E. (2003). Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 397-423.

- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., Hurst, G.D.D. (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular ecology*, 18(22): 4541-4550.
- Gaunet, A., Dincă, V., Dapporto, L., Montagud, S., Vodă, R., Schär, S., ... & Vila, R. (2019). Two consecutive Wolbachia-mediated mitochondrial introgressions obscure taxonomy in Palearctic swallowtail butterflies (Lepidoptera, Papilionidae). *Zoologica Scripta*, 48(4), 507-519.
- Ghiselli, F., Gomes-dos-Santos, A., Adema, C. M., Lopes-Lima, M., Sharbrough, J., & Boore, J. L. (2021). Molluscan mitochondrial genomes break the rules. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1825), 20200159.
- Glom, H., Quattrini, A., Rodríguez, E., Titus, B. M., & Daly, M. (2021). Comparison of sequence-capture and ddRAD approaches in resolving species and populations in hexacorallian anthozoans. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 163, 107233.
- Golding, Y. C., Edmunds, M., Ennos, A. R. (2005). Flight behaviour during foraging of the social wasp *Vespa vulgaris* (Hymenoptera: Vespidae) and four mimetic hoverflies (Diptera: Syrphidae) *Sericomyia silentis*, *Myathropa florea*, *Helophilus* sp. and *Syrphus* sp. *Journal of experimental biology*, 208(23), 4523-4527.
- Gorše I., Šašić Zorić, Lj., Miličić, M., Đan, M., Ståhls, G., Vujić, A. (2022) Spatial patterns of *COI* haplotype diversity in response to environmental factors case study on *Merodon aerarius* (Diptera: Syrphidae). Book of Abstracts. 11th International Symposium on Syrphidae, Barcelonnette, France, 5-10 September, p. 47.
- Goulding, T.C. and Dayrat, B. (2016) Integrative taxonomy: Ten years of practice and looking into the future. *Archives of Zoological Museum of Lomonosov Moscow State University*, 54: 116- 133.
- Gutiérrez-Rodríguez, J., Zaldívar-Riverón, A., Solano-Zavaleta, I., Campbell, J. A., Meza-Lázaro, R. N., Flores-Villela, O., & de Oca, A. N. M. (2021). Phylogenomics of the Mesoamerican alligator-lizard genera *Abronia* and *Mesaspis* (Anguillidae: Gerrhonotinae) reveals multiple independent clades of arboreal and terrestrial species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 154, 106963.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41: 95-98.
- Haarto, A., & Ståhls, G. (2014). When mtDNA *COI* is misleading: congruent signal of *ITS2* molecular marker and morphology for North European *Melanostoma Schiner*, 1860 (Diptera, Syrphidae). *ZooKeys*, (431), 93.
- Harrison, R.G. and Larson, E.L. (2014) Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *Journal of Heredity*, 105(S1): 795-809
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R. (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society. B*, 270(1512): 313-321. doi:10.1098/rspb.2002.2218
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R. (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society. B*, 270(Suppl 1): S96-S99. doi:10.1098/rsbl.2003.0025

- Huemer, P., Mutanen, M., Sefc, K. M., & Hebert, P. D. (2014). Testing DNA barcode performance in 1000 species of European Lepidoptera: large geographic distances have small genetic impacts. *Plos one*, 9(12), e115774.
- Hewitt, G. M. (2011). Quaternary phylogeography: The roots of hybrid zones. *Genetica*, 139(5), 617–638. <https://doi.org/10.1007/s10709-011-9547-3>
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., & Werren, J. H. (2008). How many species are infected with *Wolbachia*?—a statistical analysis of current data. *FEMS microbiology letters*, 281(2), 215-220.
- Hill, G. E. (2016). Mitonuclear coevolution as the genesis of speciation and the mitochondrial DNA barcode gap. *Ecology and evolution*, 6(16), 5831-5842.
- Hill, G. E. (2020). Mitonuclear compensatory coevolution. *Trends in Genetics*, 36(6), 403-414.
- Hill, G.E. (2019) Mitonuclear ecology. Oxford University Press, Oxford. <https://doi.org/10.1093/oso/97801198818250.001.0001>
- Hill GE (2017) The mitonuclear compatibility species concept. *Auk* 134:393-409. <https://doi.org/10.1642/AUK-16-201.1>
- Hinojosa, J. C., Koubínová, D., Szenteczki, M. A., Pitteloud, C., Dincă, V., Alvarez, N., & Vila, R. (2019). A mirage of cryptic species: genomics uncover striking mitonuclear discordance in the butterfly *Thymelicus sylvestris*. *Molecular ecology*, 28(17), 3857-3868.
- Hochkirch, A., Casino, A., Penev, L., Allen, D., Tilley, L., Georgiev, T., ... & Barov, B. (2022). European red list of insect taxonomists. Publications Office of the European Union [In EN]. URL: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/1a6d50f5-801a-11ed-9887-01aa75ed71a1>.
- Hubert, N. and Hanner, R. (2015) DNA Barcoding, species delineation and taxonomy: a historical perspective. *DNA Barcodes*, 3(1): 44-58.
- Hughes, P. D., Woodward, J. C., Van Calsteren, P. C., Thomas, L. E., & Adamson, K. R. (2010). Pleistocene ice caps on the coastal mountains of the Adriatic Sea. *Quaternary Science Reviews*, 29(27–28), 3690–3708. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2010.06.032>
- Hurkmans, W. (1993) A monograph of *Merodon* (Diptera: Syrphidae). Part 1. *Tijdschrift voor entomologie*, 136: 147-234.
- Hurst, G. D., & Jiggins, F. M. (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1572), 1525-1534.
- Ingvarsson, P. K., Ribstein, S., & Taylor, D. R. (2003). Molecular evolution of insertions and deletion in the chloroplast genome of *Silene*. *Molecular Biology and Evolution*, 20(11), 1737–1740. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg163>
- Ivanov, V., Blagoev, G., Danflous, S., Gajdoš, P., Høye, T. T., Lee, K. M., ... & Mutanen, M. (2023). Across mountains and ocean: species delimitation and historical connectivity in Holarctic and Arctic-Alpine wolf spiders (Lycosidae, Pardosa). *Insect Systematics and Diversity*, 7(5), 1.
- Ivanov, V., Lee, K. M., & Mutanen, M. (2018). Mitonuclear discordance in wolf spiders: Genomic evidence for species integrity and introgression. *Molecular Ecology*, 27(7), 1681-1695.

- Jagielski, Tomasz, Jan Gawor, Zofia Bakula, Przemyslaw Decewicz, Kacper Maciszewski, and Anna Karnkowska. "cytb as a new genetic marker for differentiation of *Prototheca* species." *Journal of Clinical Microbiology* 56, no. 10 (2018), 10-1128.
- Jeyaprakash A, Hoy MA (2000) Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology* 9, 393–405.
- Jovičić, S., Burgio, G., Diti, I., Krašić, D., Markov, Z., Radenković, S., Vujić, A. (2017). Influence of landscape structure and land use on *Merodon* and *Cheilosia* (Diptera: Syrphidae): contrasting responses of two genera. *Journal of Insect Conservation*, 21(1), 53–64. <https://doi.org/10.1007/s10841-016-9951-1>
- Katoh, K., Asimenos, G., & Toh, H. (2009). Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Bioinformatics for DNA sequence analysis*, 39-64.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Klopfstein, S., Kropf, C., & Baur, H. (2016). *Wolbachia* endosymbionts distort DNA barcoding in the parasitoid wasp genus *Diplazon* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 177(3), 541-557.
- Kim, D., Taylor, A. T., & Near, T. J. (2022). Phylogenomics and species delimitation of the economically important Black Basses (Micropterus). *Scientific Reports*, 12(1), 9113.
- Kornilios, P., Thanou, E., Lymberakis, P., Ilgaz, Ç., Kumlutaş, Y., & Leaché, A. (2019). Genome-wide markers untangle the green-lizard radiation in the Aegean Sea and support a rare biogeographical pattern. *Journal of Biogeography*, 46(3), 552-567.
- Kozlov, M. V., Mutanen, M., Lee, K. M., & Huemer, P. (2017). Cryptic diversity in the long-horn moth *Nemophora degeerella* (Lepidoptera: Adelidae) revealed by morphology, DNA barcodes and genome-wide ddRAD-seq data. *Systematic Entomology*, 42(2), 329-346.
- Kočiš Tubić, N., Ståhls, G., Ačanski, J., Djan, M., Vidaković, D. O., Hayat, R., Khaghaninia, S., & Radenković, S. (2018). An integrative approach in the assessment of species delimitation and structure of the *Merodon nanus* species group (Diptera: Syrphidae). *Organisms Diversity & Evolution*, 18(4), 479–497. <https://doi.org/10.1007/s13127-018-0381-7>
- Kress, W. J., García-Robledo, C., Uriarte, M., & Erickson, D. L. (2015). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in ecology & evolution*, 30(1), 25-35.
- Kryštufek, B., Zorenko, T., & Buzan, E. V. (2012). New insights into the taxonomy and phylogeny of social voles inferred from mitochondrial cytochrome b sequences. *Mammalian Biology*, 77(3), 178-182.
- Kukla, G. (2005). Saalian supercycle, Mindel/Riss interglacial and Milankovitch's dating. *Quaternary Science Reviews*, 24(14–15), 1573–1583. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2004.08.023>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6): 1547.
- Kurina, O., Mantič, M., & Ševčík, J. (2017). A remarkable new genus of Keroplatidae (Insecta, Diptera) from the Afrotropical region, with DNA sequence data. *African Invertebrates*, 58(1), 93-105.

- Larsson, M. (2005). Higher pollinator effectiveness by specialist than generalist flower-visitors of unspecialized *Knautia arvensis* (Dipsacaceae). *Oecologia*, 146(3), 394-403.
- Leavey, A., Taylor, C. H., Symonds, M. R., Gilbert, F., Reader, T. (2021). Mapping the evolution of accurate Batesian mimicry of social wasps in hoverflies. *Evolution*, 75(11), 2802-2815.
- Lecaudey, L. A., Schliewen, U. K., Osinov, A. G., Taylor, E. B., Bernatchez, L., & Weiss, S. J. (2018). Inferring phylogenetic structure, hybridization and divergence times within Salmoninae (Teleostei: Salmonidae) using RAD-sequencing. *Molecular phylogenetics and evolution*, 124, 82-99.
- Lane, N. (2009) On the origin of bar codes: genetic sequences in a cell's mitochondria can be used to accurately determine species. Could this be because they are responsible for creating what they identify? *Nature*, 462(7271), 272-275.
- Leigh, J.W. and Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116.
- Léveillé-Bourret, É., Chen, B. H., Garon-Labrecque, M. È., Ford, B. A., & Starr, J. R. (2020). RAD sequencing resolves the phylogeny, taxonomy and biogeography of Trichophoreae despite a recent rapid radiation (Cyperaceae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 145, 106727.
- Lewis, P. O. 2001. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Systematic Biology* 50, 913-925.
- Likov, L., Vujić, A., Tubić, N. K., Đan, M., Veličković, N., Rojo, S., ... & Radenković, S. (2019). Systematic position and composition of *Merodon nigratarsis* and *M. avidus* groups (Diptera, Syrphidae) with a description of four new hoverflies species. *Contributions to Zoology*, 89(1), 74-125.
- Linnen, C. R., & Farrell, B. D. (2007). Mitonuclear discordance is caused by rampant mitochondrial introgression in Neodiprion (Hymenoptera: Diprionidae) sawflies. *Evolution*, 61(6), 1417-1438.
- Liu, Shao-Ying, Kai He, Shun-De Chen, Wei Jin, Robert W. Murphy, Ming-Kun Tang, Rui Liao, and Feng-Jun Li. "How many species of *Apodemus* and *Rattus* occur in China? A survey based on mitochondrial *Cyt b* and morphological analyses." *Zoological research* 39, no. 5 (2018): 309.
- Manthey, J. D., Campillo, L. C., Burns, K. J., & Moyle, R. G. (2016). Comparison of target-capture and restriction-site associated DNA sequencing for phylogenomics: a test in cardinalid tanagers (Aves, Genus: *Piranga*). *Systematic biology*, 65(4), 640-650.
- Mao, X., & Rossiter, S. J. (2020). Genome-wide data reveal discordant mitonuclear introgression in the intermediate horseshoe bat (*Rhinolophus affinis*). *Molecular phylogenetics and evolution*, 150, 106886.
- Marcos-García, M. Á., Vujić, A., Ricarte, A., & Ståhls, G. (2011). Towards an integrated taxonomy of the *Merodon equestris* species complex (Diptera: Syrphidae) including description of a new species, with additional data on Iberian *Merodon*. *The Canadian Entomologist*, 143(4), 332-348. <https://doi.org/10.4039/n11-013>
- Marcos-García, M.A., Vujić, A. and Mengual, X. (2007) Revision of Iberian species of the genus *Merodon* (Diptera: Syrphidae). *European Journal of Entomology*, 104(3): 531-572.

- Masetti, A., Luchetti, A., Sommaggio, D., Burgio, G. and Mantovani, B. (2006) Phylogeny of *Chrysotoxum* species (Diptera: Syrphidae) inferred from morphological and molecular characters. *European Journal of Entomology*, 103(2): 459-467. doi:10.14411/eje.2006.059
- Marshman, J., Blay-Palmer, A., Landman, K. (2019) Anthropocene crisis: climate change, pollinators, and food security. *Environments*, 6(2): 22.
- Meigen, J.W. (1803). Versuch einer neuen Gattungs-Eintheilung der europäischen zweiflügeligen Insekten. *Magazin für Insektenkunde*. 2, 259-281.
- Meigen, J.W. (1822) *Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten*. Dritter Theil. Beaufort, pp. 22–32.
- Mengual, X. (2020). Phylogenetic relationships of the bacchine flower flies (Diptera: Syrphidae) based on molecular characters, with a description of a new species of *Melanostoma* (Schiner, 1860). *Contributions to Zoology*, 89(2), 210-244.
- Mengual, X., Ståhls, G. and Rojo, S. (2008) Molecular phylogeny of *Allograpta* (Diptera, Syrphidae) reveals diversity of lineages and non-monophyly of phytophagous taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(3): 715-727. doi:10.1016/j.ympev.2008.09.011
- Mengual, X., Ståhls, G., Rojo, S. (2015). Phylogenetic relationships and taxonomic ranking of pipizine flower flies (Diptera: Syrphidae) with implications for the evolution of aphidophagy. *Cladistics*, 31(5), 491-508.
- Mengual, X., Ståhls, G., Vujić, A., & Marcos-García, M. (2006). Integrative taxonomy of Iberian *Merodon* species (Diptera, Syrphidae). *Zootaxa*, 1377, 1–26
- Milankov, V., Ståhls, G., Vujić, A. (2008) Molecular diversity of populations of the *Merodon ruficornis* group (Diptera, Syrphidae) on the Balkan Peninsula. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46(2): 143-152.
- Milankovitch, M. (1941). Canon of insolation and the ice age problem. Royal Academy of Serbia, 133, 633.
- Miller, M. A., Pfeifer, W., Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA., 1–8. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>
- Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Mondragon-Palomino, M., Procaccio, V., Gaut, B. and Wallace, D.C. (2006) Adaptive selection of mitochondrial complex I subunits during primate radiation. *Gene*, 378: 11-18.
- Miranda, G. F., Skevington, J., Marshall, S., & Kelso, S. (2016). The genus *Ocyptamus* Macquart (Diptera: Syrphidae): a molecular phylogenetic analysis. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 74, 160-176.
- Moore, C. D., Hassall, C. (2016). A bee or not a bee: an experimental test of acoustic mimicry by hoverflies. *Behavioral Ecology*, arw107.
- Morales, H. E., Pavlova, A., Joseph, L., Sunnucks, P. (2015) Positive and purifying selection in mitochondrial genomes of a bird with mitonuclear discordance. *Molecular Ecology*, 24(11): 2820-2837.

- Mutanen, M., Kivelä, S. M., Vos, R. A., Doorenweerd, C., Ratnasingham, S., Hausmann, A., ... & Godfray, H. C. J. (2016). Species-level para-and polyphyly in DNA barcode gene trees: strong operational bias in European Lepidoptera. *Systematic biology*, 65(6), 1024-1040.
- Nagy, L. G., Kocsubé, S., Csanádi, Z., Kovács, G. M., Petkovits, T., Vágvölgyi, C., & Papp, T. (2012). Re-mind the gap! Insertion– deletion data reveal neglected phylogenetic potential of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) of fungi. *PLoS ONE*, 7(11), e49794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049794>
- Nascimento, J. D., Da Rosa, J. A., Salgado-Roa, F. C., Hernandez, C., Pardo-Diaz, C., Alevi, K. C. C., ... & Ramirez, J. D. (2019). Taxonomical over splitting in the *Rhodnius prolixus* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) clade: Are *R. taquarussuensis* (da Rosa et al., 2017) and *R. neglectus* (Lent, 1954) the same species?. *PLoS One*, 14(2), e0211285.
- Nedeljković, Z., Ačanski, J., Đan, M., Obreht-Vidaković, D., Ricarte, A., & Vujić, A. (2015). An integrated approach to delimiting species borders in the genus *Chrysotoxum* Meigen, 1803 (Diptera: Syrphidae), with description of two new species. *Contributions to Zoology*, 84(4), 285–304. <https://doi.org/10.1163/18759866-08404002>
- Nedeljković, Z., Ricarte, A., Šašić Zorić, L., Djan, M., Hayat, R., Vujić, A., & Marcos-García, M. Á. (2020). Integrative taxonomy confirms two new West-Palaeartic species allied with *Chrysotoxum vernale* Loew, 1841 (Diptera: Syrphidae). *Organisms Diversity & Evolution*, 20(4), 821–833. <https://doi.org/10.1007/s13127-020-00465-w>
- Nicolas, V., Schaeffer, B., Missoup, A. D., Kennis, J., Colyn, M., Denys, C., ... & Laredo, C. (2012). Assessment of three mitochondrial genes (16S, Cytb, CO1) for identifying species in the Praomyini tribe (Rodentia: Muridae). *PLoS one*, 7(5), e36586.
- Ogden, T. H., & Rosenberg, M. S. (2007). How should gaps be treated in parsimony? A comparison of approaches using simulation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(3), 817–826. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.07.021>
- Orford, K. A., Vaughan, I. P., Memmott, J. (2015). The forgotten flies: the importance of non-syrphid Diptera as pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1805), 20142934. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2934>
- Ortiz, D., Pekar, S., & Dianat, M. (2022). Phylogenomics and loci dropout patterns of deeply diverged *Zodarion* ant-eating spiders suggest a high potential of RAD-seq for genus-level spider phylogenetics. *Cladistics*, 38(3), 320-334.
- Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I. and Vences, M. (2010) The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7: 1-14. doi:<https://doi.org/10.1186/1742-9994-7-16>
- Papakostas, S., Michaloudi, E., Proios, K., Brehm, M., Verhage, L., Rota, J., ... & Declerck, S. A. (2016). Integrative taxonomy recognizes evolutionary units despite widespread mitonuclear discordance: evidence from a rotifer cryptic species complex. *Systematic Biology*, 65(3), 508-524.
- Patwardhan, A., Ray, S., & Roy, A. (2014). Molecular markers in phylogenetic studies-a review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 2014
- Paško, Ł., Ericson, P. G., & Elzanowski, A. (2011). Phylogenetic utility and evolution of indels: A study in neognathous birds. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(3), 760–771. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.07.021>

- Penney, H. D., Hassall, C., Skevington, J. H., Lamborn, B., Sherratt, T. N. (2014). The relationship between morphological and behavioral mimicry in hover flies (Diptera: Syrphidae). *The American Naturalist*, 183(2), 281-289.
- Pentinsaari, M., Hebert, P. D., & Mutanen, M. (2014). Barcoding beetles: a regional survey of 1872 species reveals high identification success and unusually deep interspecific divergences. *PLoS One*, 9(9), e108651.
- Perera, T., Schwarz, F., Muzeniek, T., Siriwardana, S., Becker-Ziaja, B., Perera, I. C., ... & Kohl, C. (2022). First Complete Cytochrome B Sequences and Molecular Taxonomy of Bat Species from Sri Lanka. *Animals*, 12(13), 1674.
- Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., & Hoekstra, H. E. (2012). Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PloS one*, 7(5), e37135.
- Popović, D., Ačanski, J., Djan, M., Obreht, D., Vujić, A., & Radenković, S. (2015). Sibling species delimitation and nomenclature of the *Merodon avidus* complex (Diptera: Syrphidae). *European Journal of Entomology*, 112(4). <https://doi.org/10.14411/eje.2015.100>
- Preradović, J., Andrić, A., Radenković, S., Šašić Zorić, L., Pérez-bañón, C., Campoy, A., Vujić, A. (2018). Pupal stages of three species of the phytophagous genus *Merodon* Meigen (Diptera: Syrphidae). *Zootaxa*, 4420(2), 229–242. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4420.2.5>
- Prous, M., Lee, K. M., & Mutanen, M. (2020). Cross-contamination and strong mitonuclear discordance in *Empria* sawflies (Hymenoptera, Tenthredinidae) in the light of phylogenomic data. *Molecular phylogenetics and evolution*, 143, 106670.
- Radenković, S., Šašić Zorić, L.J., Đan, M., ObrehtVidaković, D., Ačanski, J., Ståhls, G., Veličković, N., Markov, Z., Petanidou, T., Kočič Tubić, N. & Vujić, A. (2018) Cryptic speciation in the *Merodon luteomaculatus* complex (Diptera: Syrphidae) from the eastern Mediterranean. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 56 (2), 170–191. <https://doi.org/10.1111/jzs.12193>
- Radenković, S., Vujić, A., Šimić, S. (2002) On the identity and synonymy of two species from *Merodon ruficornis* Meigen group (Diptera: Syrphidae). *Acta Entomologica Serbica*, 7(1/2): 51-57.
- Radenković, S., Vujić, A., Vidaković, D. O., Djan, M., Milić, D., Veselić, S., Ståhls, G., & Petanidou, T. (2020). Sky island diversification in the *Merodon rufus* group (Diptera, Syrphidae)—Recent vicariance in south-east Europe. *Organisms Diversity & Evolution*, 20, 345–368. <https://doi.org/10.1007/s13127-020-00440-5>
- Rader, R., Cunningham, S.A., Howlett, B.G., Inouye, D.W. (2020) Non-bee insects as visitors and pollinators of crops: Biology, ecology, and management. *Annual review of entomology*, 65: 391-407.
- Raguso, R. A. (2020). Don't forget the flies: dipteran diversity and its consequences for floral ecology and evolution. *Applied Entomology and Zoology*, 55(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s13355-020-00668-9>
- Rambaut, A. (2018). FigTree: A graphical viewer of phylogenetic trees. Version, 1(4), 4. 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. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>

- Rancilhac, L., Goudarzi, F., Gehara, M., Hemami, M. R., Elmer, K. R., Vences, M., & Steinfarz, S. (2019). Phylogeny and species delimitation of near Eastern *Neurergus* newts (Salamandridae) based on genome-wide RADseq data analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 133, 189-197.
- Razkin, O., Sonet, G., Breugelmanns, K., Madeira, M. J., Gómez-Moliner, B. J., & Backeljau, T. (2016). Species limits, interspecific hybridization and phylogeny in the cryptic land snail complex *Pyramidula*: the power of RADseq data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 101, 267-278.
- Reemer, M. and Stähls, G. (2013) Phylogenetic relationships of Microdontinae (Diptera: Syrphidae) based on molecular and morphological characters. *Systematic Entomology*, 38(4): 661-688.
- Reyes-Velasco, J., Manthey, J. D., Freilich, X., & Boissinot, S. (2018). Diversification of African tree frogs (genus *Leptopelis*) in the highlands of Ethiopia. *Molecular Ecology*, 27(9), 2256-2270.
- Ricarte, A., Marcos-García, M.A. and Rotheray, G.E. (2008) The early stages and life histories of three *Eumerus* and two *Merodon* species (Diptera: Syrphidae) from the Mediterranean region. *Entomologica Fennica*, 19(2): 129-141.
- Ricarte, A., Souba-Dols, G.J., Hauser, M. & Marcos-García, M.Á. (2017) A review of the early stages and host plants of the genera *Eumerus* and *Merodon* (Diptera: Syrphidae), with new data on four species. PLoS ONE, 12 (12), e0189852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189852>
- Řičan, O., Řičanová, Š., Almirón, A., Casciotta, J., & Piálek, L. (2021). Parallel evolution of a new sympatric species pair of *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae) from Misiones, Argentina with a review of biogeography and mitonuclear discordance in the *C. mandelburgeri* species complex. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 59(8), 2134-2149.
- Roch, S., & Steel, M. (2015). Likelihood-based tree reconstruction on a concatenation of aligned sequence data sets can be statistically inconsistent. *Theoretical population biology*, 100, 56-62.
- Rodríguez, A., Burgon, J. D., Lyra, M., Irisarri, I., Baurain, D., Blaustein, L., ... & Vences, M. (2017). Inferring the shallow phylogeny of true salamanders (*Salamandra*) by multiple phylogenomic approaches. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 115, 16-26.
- Rodriguez, F.J., Oliver, J.L., Marin, A. and Medina, J.R. (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*, 142(4): 485-501. PMID: 2338834
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
- Rondani, C. (1843) Diptères nouveaux d'Italie. *Revue Zoologique par la Société Cuvierienne*, 6, 43-44.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3): 539-542.
- Rotheray, G.E. and Gilbert, F. (2011) *The natural history of hoverflies*. Cardigan: Forrest text
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., Sánchez-Gracia, A. (2017) DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, 34(12): 3299-3302.

- Ruiz-Arrondo, I., Veiga, J., Adler, P. H., Collantes, F., Oteo, J. A., & Valera, F. (2023). Integrated taxonomy of black flies (Diptera: Simuliidae) reveals unexpected diversity in the most arid ecosystem of Europe. *Plos one*, 18(11), e0293547.
- Sack, P. (1913) Zwei neuepalaarktischen *Merodon*-Arten. *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici*, 11, 620–622.
- Salokannel, J., Lee, K. M., Rinne, A., & Mutanen, M. (2021). ddRAD sequencing sheds light on low interspecific and high intraspecific mtDNA divergences in two groups of caddisflies. *Insect Systematics and Diversity*, 5(5), 4.
- Schlick-Steiner, B.C., Steiner, F.M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E. and Crozier, R.H. (2010) Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual review of entomology*, 55: 421-438.
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers—just a matter of fashion?. *Nature reviews genetics*, 5(1), 63-69.
- Secchi-Petretto, G., Englmaier, G. K., Weiss, S. J., Antonov, A., Persat, H., Denys, G. P., ... & Froufe, E. (2023). Evaluating a species phylogeny using ddRAD SNPs: Cyto-nuclear discordance and introgression in the salmonid genus *Thymallus* (Salmonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 178, 107654.
- Sihvonen, P., Lee, K. M., Lundsten, K. E., & Mutanen, M. (2020). Genomic evidence suggests *Mesapamea remmi* is an imaginary species (Lepidoptera: Noctuidae). *Systematic Entomology*, 45(2), 302-311.
- Simmons, M. P., Ochoterena, H. (2000). Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic biology*, 49(2), 369–381. <https://doi.org/10.1093/sysbio/49.2.369>
- Simões P.M., Mialdea G., Reiss D., Sagot M.F., Charlat S. (2011). *Wolbachia* detection: an assessment of standard PCR protocols. *Molecular Ecology Resources* 11, 567–572.
- 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, 651–701. <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>
- Speight, M. C. D. (2020). StN key for the identification of the genera of European Syrphidae 2020. *Syrph the Net, the database of European Syrphidae (Diptera)*, 105, 1-46.
- Speight, M.C.D., Castella, E., Obrdlik, P. (2000) Syrph the Net: a database of biological information about European Syrphidae (Diptera) and its use in relation to the conservation of biodiversity. *Biodiversity: the Irish dimension*, 156-171.
- Springer, M. S., & Gatesy, J. (2018). On the importance of homology in the age of phylogenomics. *Systematics and biodiversity*, 16(3), 210-228.
- Ståhls, G., & Nyblom, K. (2000). Phylogenetic analysis of the genus *Cheilosia* (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial *COI* sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 15(2), 235-241.
- Ståhls, G., Rotheray, G., & Thompson, F. C. (2023). Exploring the intra-tribal relationships of Volucellini (Diptera Syrphidae) using molecular and morphological characters. In *Contributions to Dipterology in honour of F. Christian Thompson* (pp. 237-244).

- Ståhls, G., Stuke, J. H., Vujic, A., Doczkal, D., & Muona, J. (2004). Phylogenetic relationships of the genus *Cheilosia* and the tribe Rhingiini (Diptera, Syrphidae) based on morphological and molecular characters. *Cladistics*, 20(2), 105-122.
- Ståhls, G., Vujic, A., Pérez-Bañón, C., Radenković, S., Rojo, S., Petanidou, T. (2009) *COI* barcodes for identification of *Merodon* hoverflies (Diptera, Syrphidae) of Lesvos Island, Greece. *Molecular Ecology Resources*, 9(6): 1431-1438.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Suchan, T., Espíndola, A., Rutschmann, S., Emerson, B. C., Gori, K., Dessimoz, C., ... & Alvarez, N. (2017). Assessing the potential of RAD-sequencing to resolve phylogenetic relationships within species radiations: The fly genus *Chiastocheta* (Diptera: Anthomyiidae) as a case study. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 114, 189-198.
- Šašić Zorić, L. (2018). Молекуларни диверзитет *Merodon aureus* групе (Diptera: Syrphidae). *Универзитет у Новом Саду*.
- Šašić Zorić, L., Ačanski, J. M., Đan, M. R., Kočiš Tubić, N. S., Veličković, N. N., Radenković, S. R., & Vujić, A. A. (2018). Integrative taxonomy of *Merodon caeruleus* complex (Diptera: Syrphidae)-Evidence of cryptic speciation. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, 135, 103–118. <https://doi.org/10.2298/ZMSPN1835103>
- Šašić, L., Ačanski, J., Vujić, A., Ståhls, G., Radenković, S., Milić, D., Obreht Vidaković, D. & Đan, M. (2016) Molecular and morphological inference of three cryptic species within the *Merodon aureus* species group (Diptera: Syrphidae). *PLoS One*, 11(8), e0160001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160001>
- Šašić Zorić, Lj., Ačanski, J., Vujić, A., Ståhls, G., Djan, M., & Radenković, S. (2020). Resolving the taxonomy of the *Merodon dobrogensis* species subgroup (Diptera: Syrphidae), with the description of a new species. *The Canadian Entomologist*, 152(1), 36-59.
- Šašić Zorić, L., Ståhls, G., & Đan, M. (2019). First record of the bacterial endosymbiont *Wolbachia* for phytophagous hoverflies from genus *Merodon* (Diptera: Syrphidae). *Entomological Science*, 22(3), 283–296. <https://doi.org/10.1111/ens.12361>
- Strobl, P.G. (1900) Dipteren fauna von Bosnien, Herzegovina und Dalmatia. *Bosnisch-Herzegowinischen Landesmuseums Sarajevo*, 7, 552–670.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. G., & Cosson, J. F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7(4), 453–464. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00289.x>
- Tamuri, A., & Goldman, N. (2017). Avoiding ascertainment bias in the maximum likelihood inference of phylogenies based on truncated data. *BioRxiv*, 186478.
- Thomson, R. C., Shedlock, A. M., Edwards, S. V., & Shaffer, H. B. (2008). Developing markers for multilocus phylogenetics in non-model organisms: a test case with turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(2), 514-525.
- Thompson, F. C., Rotheray, G. (1998). Family syrphidae. *Manual of Palaearctic Diptera*.

- Toivonen, M., Karimaa, A. E., Herzon, I., Kuussaari, M. (2022). Flies are important pollinators of mass-flowering caraway and respond to landscape and floral factors differently from honeybees. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 323, 107698.
- Uhrová, M., Mikula, O., Bennett, N. C., Van Daele, P., Piálek, L., Bryja, J., ... & Šumbera, R. (2022). Species limits and phylogeographic structure in two genera of solitary African mole-rats *Georychus* and *Heliophobius*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 167, 107337.
- Van der Goot, V.S. (1964) Fluke's catalogue of Neotropical Syrphidae (Insecta, Diptera), a critical study with an appendix on new names in Syrphidae. *Beaufortia*, 10(127), 212–221.
- Veselić, S. (2018). *Sistematika roda Merodon (Meigen, 1803)(Diptera: Syrphidae) na osnovu morfoloških i molekularnih karaktera* (Doctoral dissertation, University of Novi Sad (Serbia)).
- Vujić, A., Gilbert, F., Flinn, G., Englefield, ..., Vrba, J. (2022a). Pollinators on the edge: our European hoverflies. *The European Red List of Hoverflies*. Brussels, Belgium: European Commission
- Vujić, A., Marcos-García, M.Á., Sarıbiyık, S., Ricarte, A. (2011). New data on the *Merodon* Meigen 1803 fauna (Diptera: Syrphidae) of Turkey including description of a new species and changes in the nomenclatural status of several taxa. *Annales de la Société entomologique de France*, 47: 78-88.
- Vujić, A., Pérez-Bañón, C., Radenković, S., Ståhls, G., Rojo, S., Petanidou, T. & Šimić, S. (2007) Two new species of genus *Merodon* Meigen, 1803 (Syrphidae: Diptera) from the island of Lesbos (Greece), in the eastern Mediterranean. *Annales de la Société Entomologique de France*, 43 (3), 319–326. <http://dx.doi.org/10.1080/00379271.2007.10697527>
- Vujić, A., Speight, M., de Courcy Williams, M. E., Rojo, S., Ståhls, G., Radenković, S., ... & Falk, S. (2019). *Atlas of the hoverflies of Greece:(Diptera: Syrphidae)*. Brill.
- Vujić, A., Ståhls, G., Ačanski, J., Bartsch, H., Bygebjerg, R., & Stefanović, A. (2013). Systematics of Pipizini and taxonomy of European *Pipiza* Fallén: Molecular and morphological evidence (Diptera, Syrphidae). *Zoologica Scripta*, 42(3), 288–305. <https://doi.org/10.1111/zsc.12005>
- Vujić, A., Ståhls, G., Ačanski, J., Rojo, S., Pérez-Bañón, C., Radenković, S. (2018) Review of the *Merodon albifasciatus* Macquart species complex (Diptera: Syrphidae): the nomenclatural type located and its provenance discussed. *Zootaxa* 4374(1), 25–10.11646/zootaxa.4374.1.2
- Vujić, A., Šašić Zorić, L., Ačanski, J., Likov, L., Radenković, S., Djan, M., Milić, D., Šebić, A., Ranković, M. & Khaghaninia, S. (2020b). Hide-and-peek with hoverflies: *Merodon aureus*—a species, a complex or a subgroup?. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 190(3), 974–1001. <https://doi.org/10.1093/zoolinnea/zlaa016>
- Vujić, A., Radenković, S., Likov, L., Gorše, I., Djan, M., Ristić, ZM, & Barkalov, AV (2022b). Three new species of the *Merodon ruficornis* group (Diptera: Syrphidae) discovered at the edge of its range. *Zootaxa* , 5182 (4), 301-347.
- Vujić, A., Radenković, S., Likov, L., Andrić, A., Janković, M., Ačanski, J., Popov, G., de Courcy Williams, M., Šašić Zorić, Lj. & Djan, M. (2020a). Conflict and congruence between morphological and molecular data: revision of the *Merodon constans* group (Diptera: Syrphidae). *Invertebrate Systematics*, 34(4), 449–449. <https://doi.org/10.1071/IS19047>

- Vujić, A., Radenković, S., Likov, L., & Veselić, S. (2021a). Taxonomic complexity in the genus *Merodon* Meigen, 1803 (Diptera, Syrphidae). *ZooKeys*, 1031, 85. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1031.62125>
- Vujić, A., Radenković, S., Ståhls, G., Ačanski, J., Stefanović, A., Veselić, S., Andrić, A., Hayat, R. (2012) Systematics and taxonomy of the *ruficornis* group of genus *Merodon* Meigen (Diptera: Syrphidae). *Systematic Entomology*, 37(3): 578-602.
- Vujić, A., Radenković, S., Šašić Z., L., Likov, L., Tot, T., Veselić, S., & Djan, M. (2021c). Revision of the *Merodon bombiformis* group (Diptera: Syrphidae)—rare and endemic African hoverflies. *European Journal of Taxonomy*, 755, 88-135. <https://doi.org/10.5852/ejt.2021.755.1401>
- Vujić, A., Tot, T., Andrić, A., Ačanski, J., Zorić, L. Š., Pérez-Bañón, C., ... & Radenković, S. (2021b). Review of the *Merodon natans* group with description of a new species, a key to the adults of known species of the *natans* lineage and first descriptions of some preimaginal stages. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 79, 343-378. <https://doi.org/10.3897/asp.79.e65861>
- Wagner, D.L. (2020) Insect declines in the Anthropocene. *Annual review of entomology*, 6: 457-480.
- Wang, I. J., & Bradburd, G. S. (2014). Isolation by environment. *Molecular ecology*, 23(23), 5649-5662.
- Wang, M., Zhang, Y., & Bourgoin, T. (2016). Planthopper family Issidae (Insecta: Hemiptera: Fulgoromorpha): linking molecular phylogeny with classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 105, 224-234.
- Warnow, T. (2015). Concatenation analyses in the presence of incomplete lineage sorting. *PLoS currents*, 7.
- Warnow, T. (2012). Standard maximum likelihood analyses of alignments with gaps can be statistically inconsistent. *PLoS Currents*. <https://doi.org/10.1371/currents.RRN1308>
- Weinert, L. A., Araujo-Jnr, E. V., Ahmed, M. Z., & Welch, J. J. (2015). The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1807), 20150249.
- Weiss, M., Weigand, H., Weigand, A. M., & Leese, F. (2018). Genome-wide single-nucleotide polymorphism data reveal cryptic species within cryptic freshwater snail species—The case of the *Ancylus fluviatilis* species complex. *Ecology and evolution*, 8(2), 1063-1072.
- Werren, J.H. and Windsor, D.M. (2000) *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 267(1450): 1277-1285
- Werren JH, Baldo L, Clark ME (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* 6, 741-751.
- Xiao, J. H., Wang, N. X., Li, Y. W., Murphy, R. W., Wan, D. G., Niu, L. M., ... & Huang, D. W. (2010). Molecular approaches to identify cryptic species and polymorphic species within a complex community of fig wasps. *PLoS One*, 5(11), e15067.
- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., Pang, X., Xu, H., Zhu, Y., Xiao, P., & Chen, S. (2010). Use of *ITS2* region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS ONE*, 5(10), e13102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013102>

- Yeates, D.K., Seago, A., Nelson, L., Cameron, S.L., Joseph, L.E.O. and Trueman, J.W. (2011) Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? *Systematic Entomology*, 36(2): 209-217.
- Zeng, Cong, Yangxin Tang, Martin Vastrade, Neil E. Coughlan, Ting Zhang, Yongjiu Cai, Karine Van Doninck, and Deliang Li. "Salinity appears to be the main factor shaping spatial *COI* diversity of *Corbicula* lineages within the Chinese Yangtze River Basin." *Diversity and Distributions* 29, no. 3 (2023): 364-378.
- Zeng, C., Rowden, A. A., Clark, M. R., & Gardner, J. P. (2020). Species-specific genetic variation in response to deep-sea environmental variation amongst Vulnerable Marine Ecosystem indicator taxa. *Scientific reports*, 10(1), 2844.
- Zhang, C., Yang, R., Wu, L., Luo, C., Guo, X., Deng, Y., ... & Zhang, Y. (2021). Molecular phylogeny of the *Anopheles hyrcanus* group (Diptera: Culicidae) based on rDNA-*ITS2* and mtDNA-*COII*. *Parasites & Vectors*, 14, 1-15.
- Zug, R., & Hammerstein, P. (2012). Still a host of hosts for Wolbachia: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PloS one*, 7(6), e38544.
- Yuri, T., Kimball, R. T., Harshman, J., Bowie, R. C., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Han, K. L., Hackett, S. J., Huddleston, C. J., Moore, W. S., Reddy, S., Sheldon, F. H., Steadman, D. W., Witt, C. C., & Braun, E. L. (2013). Parsimony and model-based analyses of indels in avian nuclear genes reveal congruent and incongruent phylogenetic signals. *Biology*, 2(1), 419-444. <https://doi.org/10.3390/biology2010419>

9. ПРИЛОЗИ

10.1. Прилог 1

Табела III. Листа узорака *Merodon ruficornis* групе врста са локалитетима прикупљања, као и подацима о јавно доступним секвенцама испитиваних региона које су претходно депоноване у Банку Гена.

Код	Назив врсте	Држава	Локалитет	Географска област	Приступни бројеви секвенци доступних у Банци Гена			
					5' COI	3' COI	28S	ITS2
RU189	<i>Merodon fulvitaris</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2022	Иран	Аинали	Западна Азија	ON562632	ON562632	OP114320	OP135870
RU190	<i>Merodon fulvitaris</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2022	Иран	Оскулу	Западна Азија	ON562626	ON562626	OP114314	OP135864
RU201	<i>Merodon acutus</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2022	Русија	Кавказ	Северни Кавказ	ON562698	ON562698	OP114384	OP135936
RU202	<i>Merodon acutus</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2022	Русија	Кавказ	Северни Кавказ	ON562699	ON562699	OP114385	OP135937
RU192	<i>Merodon trispinus</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2022	Турска	Бабадаг	Анадолија	ON562605	ON562605	OP114293	-
RU193	<i>Merodon trispinus</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2022	Турска	Бабадаг	Анадолија	ON562606	ON562606	OP114294	-
RU194	<i>Merodon trispinus</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2022	Турска	Бабадаг	Анадолија	ON562607	ON562607	OP114295	-
RU191	<i>Merodon trispinus</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2022	Турска	Бонцук Даглари	Анадолија	ON562604	ON562604	OP114292	-
RU196	<i>Merodon trispinus</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2022	Турска	Фетије	Анадолија	-	-	-	-
RU197	<i>Merodon trispinus</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2022	Турска	Фетије	Анадолија	-	-	-	-
RU198	<i>Merodon trispinus</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2022	Турска	Фетије	Анадолија	-	-	-	-
RU199	<i>Merodon trispinus</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2022	Турска	Измир	Анадолија	-	-	-	-
RU85	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Хрватска	Истра	Балкан	ON562598	ON562598	OP114286	OP135840
RU219	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Хрватска	Крк	Балкан	-	-	-	-
RU217	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Хрватска	Крк	Балкан	-	-	-	-
RU218	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Хрватска	Крк	Балкан	-	-	-	-
RU220	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Хрватска	Крк	Балкан	-	-	-	-
RU221	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Хрватска	Црес	Балкан	-	-	-	-
RU223	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Хрватска	Црес	Балкан	-	-	-	-
RU224	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Хрватска	Црес	Балкан	-	-	-	-
RU225	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Хрватска	Црес	Балкан	-	-	-	-
RU292	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Словенија	Шмарје	Балкан	-	-	-	-
RU114	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Грчка	Драма	Балкан	ON562665	ON562665	OP114352	OP135903
RU111	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Грчка	Драма	Балкан	ON562663	ON562663	OP114350	OP135901
RU112	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Грчка	Драма	Балкан	ON562669	ON562669	OP114355	OP135907
RU113	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Грчка	Драма	Балкан	ON562664	ON562664	OP114351	OP135902
RU115	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Грчка	Драма	Балкан	ON562666	ON562666	OP114353	OP135904
RU188	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Црна Гора	Дурмитор	Балкан	ON562625	ON562625	OP114313	OP135863
RU80	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Црна Гора	Дурмитор	Балкан	ON562594	ON562594	OP114282	OP135836
RU81	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Црна Гора	Дурмитор	Балкан	ON562595	ON562595	OP114283	OP135837
RU82	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Црна Гора	Дурмитор	Балкан	ON562596	ON562596	OP114284	OP135838
RU83	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Црна Гора	Дурмитор	Балкан	ON562597	ON562597	OP114285	OP135839
RU90	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Црна Гора	Орјен	Балкан	ON562649	ON562649	OP114336	OP135887
RU88	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Црна Гора	Орјен	Балкан	ON562647	ON562647	OP114334	OP135885
RU89	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Црна Гора	Орјен	Балкан	ON562648	ON562648	OP114335	OP135886
RU101	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Ђердап	Балкан	ON562655	ON562655	OP114342	OP135893
RU102	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Ђердап	Балкан	ON562656	ON562656	OP114343	OP135894
RU103	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Ђердап	Балкан	ON562657	ON562657	OP114344	OP135895
RU104	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Ђердап	Балкан	ON562658	ON562658	OP114345	OP135896
RU105	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Ђердап	Балкан	ON562659	ON562659	OP114346	OP135897
RU106	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Ђердап	Балкан	ON562660	ON562660	OP114347	OP135898
RU107	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Ђердап	Балкан	ON562661	ON562661	OP114348	OP135899
RU109	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Ђердап	Балкан	ON562662	ON562662	OP114349	OP135900
RU92	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Црна Гора	Румија	Балкан	ON562651	ON562651	OP114338	OP135889
RU93	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Црна Гора	Румија	Балкан	ON562652	ON562652	OP114339	OP135890

RU96	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Стара планина	Балкан	ON562654	ON562654	OP114341	OP135892
RU94	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Вршачке планине	Балкан	ON562653	ON562653	OP114340	OP135891
RU237	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Вршачке планине	Балкан	-	-	-	-
RU235	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Фрушка гора	Балкан	-	-	-	-
RU236	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Копоник	Балкан	-	-	-	-
RU238	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Голија	Балкан	-	-	-	-
RU241	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Камена Гора	Балкан	-	-	-	-
RU243	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Златибор	Балкан	-	-	-	-
AU1844	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Проклетије	Балкан	-	-	-	-
RU298	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Србија	Ловћен	Балкан	-	-	-	-
RU325	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Украјина	Одешка област	Источна Европа	-	-	-	-
RU326	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Украјина	Одешка област	Источна Европа	-	-	-	-
RU434	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Турска	Илгас	Анадолија	-	-	-	-
RU448	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Турска	Болу	Анадолија	-	-	-	-
RU449	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Турска	Болу	Анадолија	-	-	-	-
RU450	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Турска	Болу	Анадолија	-	-	-	-
RU451	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Турска	Болу	Анадолија	-	-	-	-
RU453	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Турска	Болу	Анадолија	-	-	-	-
RU466	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Турска	Болу	Анадолија	-	-	-	-
RU465	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Турска	Болу	Анадолија	-	-	-	-
RU467	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Турска	Болу	Анадолија	-	-	-	-
RU468	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Турска	Болу	Анадолија	-	-	-	-
RU469	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Турска	Болу	Анадолија	-	-	-	-
RU471	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Турска	Болу	Анадолија	-	-	-	-
RU472	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Турска	Болу	Анадолија	-	-	-	-
RU473	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Турска	Болу	Анадолија	-	-	-	-
RU86	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Италија	Трентино	Апенинско полуострво	-	-	-	-
RU87	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Италија	Трентино	Апенинско полуострво	-	-	-	-
RU79	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Немачка	-	Средња Европа	-	-	-	-
AU1823	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Француска	Монклар	Западна Европа	-	-	-	-
AU1824	<i>Merodon armipes</i> Rondani, 1843	Француска	Монклар	Западна Европа	-	-	-	-
RU58	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Грчка	Драма	Балкан	ON562588	ON562588	OP114276	OP135831
RU59	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Грчка	Драма	Балкан	ON562589	ON562589	OP114277	OP135833
RU56	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Грчка	Драма	Балкан	-	-	-	-
RU57	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Грчка	Драма	Балкан	-	-	-	-
RU65	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Грчка	Маинало	Балкан	ON562590	ON562590	OP114278	OP135834
RU66	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Грчка	Маинало	Балкан	ON562591	ON562591	OP114279	OP135835
RU63	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Грчка	Маинало	Балкан	-	-	-	-
RU68	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Грчка	Маинало	Балкан	-	-	-	-
RU60	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Грчка	Маинало	Балкан	-	-	-	-
RU61	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Грчка	Маинало	Балкан	-	-	-	-
RU62	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Грчка	Маинало	Балкан	-	-	-	-
RU64	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Грчка	Маинало	Балкан	-	-	-	-
RU67	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Грчка	Пиндос	Балкан	ON562644	ON562644	-	OP135882
RU69	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Грчка	Пиндос	Балкан	ON562668	ON562668	-	OP135906
RU55	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Црна Гора	Дурмитор	Балкан	ON562643	ON562643	OP114331	OP135881
RU280	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Црна Гора	Маглић	Балкан	-	-	-	-
RU283	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Црна Гора	Маглић	Балкан	-	-	-	-
RU284	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Црна Гора	Маглић	Балкан	-	-	-	-
RU279	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Црна Гора	Маглић	Балкан	-	-	-	-

AU1828	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Црна Гора	Ловћен	Балкан	-	-	-	-
RU287	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Црна Гора	Ловћен	Балкан	-	-	-	-
RU290	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Црна Гора	Ловћен	Балкан	-	-	-	-
RU286	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Србија	Ђердап	Балкан	-	-	-	-
RU421	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Србија	Мироч	Балкан	-	-	-	-
RU422	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Србија	Мироч	Балкан	-	-	-	-
RU321	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Украјина	Одешка област	Источна Европа	-	-	-	-
RU322	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Украјина	Одешка област	Источна Европа	-	-	-	-
RU323	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Украјина	Запорошка област	Источна Европа	-	-	-	-
RU324	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Украјина	Запорошка област	Источна Европа	-	-	-	-
RU70	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Турска	Баликесир	Анадолија	ON562645	ON562645	OP114332	OP135883
RU71	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Турска	Баликесир	Анадолија	ON562646	ON562646	OP114333	OP135884
RU447	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Турска	Болу	Анадолија	-	-	-	-
RU452	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Турска	Болу	Анадолија	-	-	-	-
RU76	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Турска	Боздаг	Анадолија	ON562592	ON562592	OP114280	-
RU77	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Турска	Боздаг	Анадолија	ON562593	ON562593	OP114281	-
RU78	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Турска	Боздаг	Анадолија	-	-	-	-
RU72	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Турска	Боздаг	Анадолија	-	-	-	-
RU73	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Турска	Боздаг	Анадолија	-	-	-	-
RU74	<i>Merodon auripes</i> Sack, 1913	Турска	Боздаг	Анадолија	-	-	-	-
RU185	<i>Merodon hoplitis</i> Hurkmans у Vujić и сар. 2012	Црна Гора	Орјен	Балкан	ON562623	ON562623	OP114311	OP135861
RU186	<i>Merodon hoplitis</i> Hurkmans у Vujić и сар. 2012	Црна Гора	Орјен	Балкан	ON562603	ON562603	OP114291	OP135845
RU187	<i>Merodon hoplitis</i> Hurkmans у Vujić и сар. 2012	Црна Гора	Орјен	Балкан	ON562624	ON562624	OP114312	OP135862
RU351	<i>Merodon hoplitis</i> Hurkmans у Vujić и сар. 2012	Црна Гора	Орјен	Балкан	-	-	-	-
AU1848	<i>Merodon hoplitis</i> Hurkmans у Vujić и сар. 2012	Црна Гора	Лоћен	Балкан	-	-	-	-
AU1847	<i>Merodon hoplitis</i> Hurkmans у Vujić и сар. 2012	Црна Гора	Лоћен	Балкан	-	-	-	-
AU1846	<i>Merodon hoplitis</i> Hurkmans у Vujić и сар. 2012	Црна Гора	Лоћен	Балкан	-	-	-	-
RU149	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Аркадија	Балкан	ON562688	ON562688	OP114374	OP135926
RU152	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Аркадија	Балкан	ON562691	ON562691	OP114377	OP135929
RU159	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Еримантос	Балкан	ON562695	ON562695	OP114381	OP135933
RU160	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Еримантос	Балкан	ON562696	ON562696	OP114382	OP135934
RU161	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Еримантос	Балкан	ON562697	ON562697	OP114383	OP135935
RU150	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Маинало	Балкан	ON562689	ON562689	OP114375	OP135927
RU151	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Маинало	Балкан	ON562690	ON562690	OP114376	OP135928
RU153	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Маинало	Балкан	ON562692	ON562692	OP114378	OP135930
RU154	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Маинало	Балкан	ON562693	ON562693	OP114379	OP135931
RU155	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Маинало	Балкан	ON562694	ON562694	OP114380	OP135932
RU171	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Пиндос	Балкан	ON562616	ON562616	OP114304	OP135854
RU172	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Пиндос	Балкан	ON562613	ON562613	OP114301	OP135851
RU173	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Пиндос	Балкан	ON562614	ON562614	OP114302	OP135852
RU174	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Пиндос	Балкан	ON562615	ON562615	OP114303	OP135853
RU175	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Пиндос	Балкан	ON562599	ON562599	OP114287	OP135841
RU176	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Пиндос	Балкан	ON562617	ON562617	OP114305	OP135855
RU164	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Пиндос	Балкан	ON562608	ON562608	OP114296	OP135846
RU165	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Пиндос	Балкан	ON562609	ON562609	OP114297	OP135847
RU167	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Пиндос	Балкан	ON562610	ON562610	OP114298	OP135848
RU168	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Пиндос	Балкан	ON562611	ON562611	OP114299	OP135849
RU169	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Пиндос	Балкан	ON562612	ON562612	OP114300	OP135850
RU170	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Пиндос	Балкан	ON562667	ON562667	OP114354	OP135905
RU177	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Пиндос	Балкан	ON562618	ON562618	OP114306	OP135856

RU116	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Р. С. Македонија	Кожуф	Балкан	ON562670	ON562670	OP114356	OP135908
RU117	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Р. С. Македонија	Кожуф	Балкан	ON562671	ON562671	OP114357	OP135909
RU118	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Р. С. Македонија	Кожуф	Балкан	ON562672	ON562672	OP114358	OP135910
RU119	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Р. С. Македонија	Кожуф	Балкан	ON562673	ON562673	OP114359	OP135911
RU120	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Р. С. Македонија	Кожуф	Балкан	ON562674	ON562674	OP114360	OP135912
RU136	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Србија	Ђердап	Балкан	ON562681	ON562681	OP114367	OP135919
RU135	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Србија	Ђердап	Балкан	ON562680	ON562680	OP114366	OP135918
RU137	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Србија	Ђердап	Балкан	ON562682	ON562682	OP114368	OP135920
RU138	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Србија	Ђердап	Балкан	ON562683	ON562683	OP114369	OP135921
RU142	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Србија	Ђердап	Балкан	ON562684	ON562684	OP114370	OP135922
RU143	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Србија	Ђердап	Балкан	ON562685	ON562685	OP114371	OP135923
RU144	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Србија	Ђердап	Балкан	ON562686	ON562686	OP114372	OP135924
RU145	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Србија	Ђердап	Балкан	ON562687	ON562687	OP114373	OP135925
RU126	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Србија	Сува планина	Балкан	ON562675	ON562675	OP114361	OP135913
RU127	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Србија	Сува планина	Балкан	ON562676	ON562676	OP114362	OP135914
RU128	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Србија	Сува планина	Балкан	ON562677	ON562677	OP114363	OP135915
RU129	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Србија	Сува планина	Балкан	ON562678	ON562678	OP114364	OP135916
RU130	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Србија	Сува планина	Балкан	ON562679	ON562679	OP114365	OP135917
RU328	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Украјина	Одешка област	Источна Европа	-	-	-	-
RU178	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Турска	Фетије	Анадолија	ON562600	ON562600	OP114288	OP135842
RU179	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Турска	Фетије	Анадолија	ON562601	ON562601	OP114289	OP135843
RU180	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Турска	Фетије	Анадолија	ON562602	ON562602	OP114290	OP135844
RU181	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Турска	Фетије	Анадолија	ON562619	ON562619	OP114307	OP135857
AU956	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Турска	Испарта	Анадолија	-	-	-	-
AU957	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Турска	Испарта	Анадолија	-	-	-	-
AU954	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Турска	Испарта	Анадолија	-	-	-	-
AU955	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Турска	Испарта	Анадолија	-	-	-	-
RU263	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Турска	Испарта	Анадолија	-	-	-	-
RU264	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Турска	Испарта	Анадолија	-	-	-	-
RU265	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Турска	Испарта	Анадолија	-	-	-	-
RU439	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Турска	Илгаз	Анадолија	-	-	-	-
RU441	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Турска	Илгаз	Анадолија	-	-	-	-
RU259	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Лезбос	Егејски архипелаг	-	-	-	-
RU411	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Лезбос	Егејски архипелаг	-	-	-	-
RU410	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Лезбос	Егејски архипелаг	-	-	-	-
RU412	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Лезбос	Егејски архипелаг	-	-	-	-
RU415	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Лезбос	Егејски архипелаг	-	-	-	-
RU416	<i>Merodon loewi</i> Van der Goot, 1964	Грчка	Лезбос	Егејски архипелаг	-	-	-	-
RU183	<i>Merodon papillus</i> Vujić, Radenković и Pérez-Bañón y Vujić и сар., 2007	Грчка	Лезбос	Егејски архипелаг	ON562621	ON562621	OP114309	OP135859
RU182	<i>Merodon papillus</i> Vujić, Radenković и Pérez-Bañón y Vujić и сар., 2007	Грчка	Лезбос	Егејски архипелаг	ON562620	ON562620	OP114308	OP135858
RU184	<i>Merodon papillus</i> Vujić, Radenković и Pérez-Bañón y Vujić и сар., 2007	Грчка	Лезбос	Егејски архипелаг	ON562622	ON562622	OP114310	OP135860
RU398	<i>Merodon papillus</i> Vujić, Radenković и Pérez-Bañón y Vujić и сар., 2007	Грчка	Лезбос	Егејски архипелаг	-	-	-	-
AU959	<i>Merodon papillus</i> Vujić, Radenković и Pérez-Bañón y Vujić и сар., 2007	Турска	Испарта	Анадолија	-	-	-	-
AU960	<i>Merodon papillus</i> Vujić, Radenković и Pérez-Bañón y Vujić и сар., 2007	Турска	Испарта	Анадолија	-	-	-	-
RU41	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Србија	Дубашница	Балкан	ON562585	ON562585	OP114273	OP135829
RU42	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Србија	Дубашница	Балкан	ON562586	ON562586	OP114274	OP135830
RU43	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Србија	Дубашница	Балкан	ON562587	ON562587	OP114275	OP135831
RU254	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Србија	Голија	Балкан	-	-	-	-
RU255	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Србија	Голија	Балкан	-	-	-	-
FIN27	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Црна Гора	Проклетије	Балкан	-	-	-	-

RU274	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Грчка	Фалакро	Балкан	-	-	-	-
RU44	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Грчка	Олимп	Балкан	-	-	-	-
RU318	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Украјина	Крим	Источна Европа	-	-	-	-
RU45	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Турска	Рахат	Анадолија	ON562633	ON562633	OP114321	OP135871
RU46	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Турска	Рахат	Анадолија	ON562634	ON562634	OP114322	OP135872
RU47	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Турска	Рахат	Анадолија	ON562635	ON562635	OP114323	OP135873
RU48	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Турска	Рахат	Анадолија	ON562636	ON562636	OP114324	OP135874
RU49	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Турска	Рахат	Анадолија	ON562637	ON562637	OP114325	OP135875
RU50	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Турска	Рахат	Анадолија	ON562638	ON562638	OP114326	OP135876
RU51	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Турска	Рахат	Анадолија	ON562639	ON562639	OP114327	OP135877
RU52	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Турска	Рахат	Анадолија	ON562640	ON562640	OP114328	OP135878
RU53	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Турска	Рахат	Анадолија	ON562641	ON562641	OP114329	OP135879
RU54	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Турска	Рахат	Анадолија	ON562642	ON562642	OP114330	OP135880
RUT1	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Србија	Дубашница	Балкан	ON562627	ON562627	OP114315	OP135865
RUT2	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Србија	Дубашница	Балкан	ON562628	ON562628	OP114316	OP135866
RUT3	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Србија	Дубашница	Балкан	ON562629	ON562629	OP114317	OP135867
RUT4	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Србија	Дубашница	Балкан	ON562630	ON562630	OP114318	OP135868
RUT5	<i>Merodon trebevicensis</i> Strobl, 1900	Србија	Дубашница	Балкан	ON562631	ON562631	OP114319	OP135869
AU1831	<i>M. portschinskyi</i> Stackelberg, 1924	Грузија	Имеретија	Кавказ	ON880571	ON880571	-	-
AU1830	<i>M. portschinskyi</i> Stackelberg, 1924	Грузија	Имеретија	Кавказ	ON880570	ON880570	-	-
RU314	<i>M. portschinskyi</i> Stackelberg, 1924	Грузија	Имеретија	Кавказ	ON880569	ON880569	-	-
RU312	<i>M. portschinskyi</i> Stackelberg, 1924	Грузија	Имеретија	Кавказ	ON880568	ON880568	-	-
AU1820	<i>Merodon gallicus</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2012	Француска	Тенде	Западна Европа	ON880572	ON880572	-	-
AU1821	<i>Merodon ruficornis</i> Meigen, 1822	Француска	Тенде	Западна Европа	ON880573	ON880573	-	-
AU1822	<i>Merodon ruficornis</i> Meigen, 1822	Француска	Тенде	Западна Европа	-	-	-	-
RU276	<i>Merodon ruficornis</i> Meigen, 1822	Црна Гора	Дурмитор	Balkan Peninsula	-	-	-	-
AU1837	<i>Merodon ruficornis</i> Meigen, 1822	Украјина	Ивано-Франковска област	Источна Европа	-	-	-	-
AU1836	<i>Merodon ruficornis</i> Meigen, 1822	Украјина	Ивано-Франковска област	Источна Европа	-	-	-	-
AU1833	<i>Merodon ruficornis</i> Meigen, 1822	Србија	Власина	Балкан	-	-	-	-
AU1834	<i>Merodon ruficornis</i> Meigen, 1822	Црна Гора	Дурмитор	Балкан	-	-	-	-
RU210	<i>Merodon ruficornis</i> Meigen, 1822	Србија	Копаоник	Балкан	-	-	-	-
RU424	<i>Merodon ruficornis</i> Meigen, 1822	Србија	Фрушка гора	Балкан	-	-	-	-
RU425	<i>Merodon ruficornis</i> Meigen, 1822	Србија	Фрушка гора	Балкан	-	-	-	-
RU203	<i>Merodon lamellatus</i> Vujić и Radenković, 2012	Турска	Гуцуксу	Анадолија	-	-	-	-
RU444	<i>Merodon ilgazense</i> Vujić, Marcos-García, Sarýbýúýk и Ricarte у Ricarte и сар., 2011	Турска	Илгаз	Анадолија	-	-	-	-
RU437	<i>Merodon ilgazense</i> Vujić, Marcos-García, Sarýbýúýk et Ricarte in Ricarte и сар., 2011	Турска	Илгаз	Анадолија	-	-	-	-
RU438	<i>Merodon ilgazense</i> Vujić, Marcos-García, Sarýbýúýk et Ricarte in Ricarte и сар., 2011	Турска	Илгаз	Анадолија	-	-	-	-
RU445	<i>Merodon ovaloides</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2012	Турска	Илгаз	Анадолија	-	-	-	-
RU432	<i>Merodon ovaloides</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2012	Турска	Илгаз	Анадолија	-	-	-	-
RU440	<i>Merodon ovaloides</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2012	Турска	Илгаз	Анадолија	-	-	-	-
RU443	<i>Merodon ovaloides</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2012	Турска	Илгаз	Анадолија	-	-	-	-
RU433	<i>Merodon ovaloides</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2012	Турска	Илгаз	Анадолија	-	-	-	-
RU435	<i>Merodon ovaloides</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2012	Турска	Илгаз	Анадолија	-	-	-	-
RU436	<i>Merodon ovaloides</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2012	Турска	Илгаз	Анадолија	-	-	-	-
RU442	<i>Merodon ovaloides</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2012	Турска	Илгаз	Анадолија	-	-	-	-
RU446	<i>Merodon ovaloides</i> Vujić и Radenković у Vujić и сар., 2012	Турска	Илгаз	Анадолија	-	-	-	-

10.2. Прилог 2

Табела П2. Деветнаест биоклиматских варијабли коришћених за креирање модела потенцијалне дистрибуције врста.

Варијабла	Опис варијабле
bio1	Средња годишња температура - просечна годишња температура израчуната на основу средњих месечних температура. Изражава се у степенима Целзијуса.
bio2	Средња месечна температура - разлика између максималних и минималних месечних температура. Изражава се у степенима Целзијуса.
bio3	Изотерма (B1O2/B1O7) x 100 - квантификује осцилацију дневно-ноћних разлика у температури у поређењу са летње - зимским осцилацијама температуре. Изражава се у процентима.
bio4	Температурна сезоналност (стандартна девијација * 100) - температурна варијација током године (или датог просека година) заснована на стандардној девијацији месечних температурних просека. Изражава се у степенима Целзијуса.
bio5	Максимална температура најтоплијег периода - максимална месечна температура забележена у току дате године. Изражава се у степенима Целзијуса.
bio6	Минимална температура најхладнијег периода - минимална месечна температура забележена у току дате године. Изражава се у степенима Целзијуса.
bio7	Годишњи температурни опсег (B1O5-B1O6) - мера температурне варијације током датог периода. Изражава се у степенима Целзијуса.
bio8	Средња температура квартала са највећом количином падавина -квартални индекс који апроксимира средње температуре које владају током највлажнијег периода. Изражава се у степенима Целзијуса.
bio9	Средња температура квартала са најмањом количином падавина -квартални индекс који апроксимира средње температуре које владају током најсувљег периода. Изражава се у степенима Целзијуса.
bio10	Средња температура најтоплијег квартала - квартални индекс који апроксимира средње температуре које владају током најтоплијег периода. Изражава се у степенима Целзијуса.
bio11	Средња температура најхладнијег квартала - квартални индекс који апроксимира средње температуре које владају током најхладнијег периода. Изражава се у степенима Целзијуса.
bio12	Годишња количина падавина - сума укупних месечних вредности преципитације. Изражава се у милиметрима.
bio13	Преципитација у периоду са највећом количином падавина - индекс идентификује тоталну количину преципитације током највлажнијег месеца. Изражава се у милиметрима.
bio14	Преципитација у периоду са најмањом количином падавина - индекс идентификује тоталну количину преципитације током најсувљег месеца. Изражава се у милиметрима.
bio15	Сезонска количина падавина (коефицијент варијације) - мера варијације у укупним месечним количинама падавина током године. Овај индекс представља однос стандардне девијације укупне месечне преципитације и средње вредности укупне месечне преципитације. Изражава се у процентима.
bio16	Преципитација квартала са највећом количином падавина - квартални индекс који апроксимира тоталну количину преципитације током највлажнијег периода. Изражава се у милиметрима.
bio17	Преципитација квартала са најмањом количином падавина - квартални индекс који апроксимира тоталну количину преципитације током најсувљег периода. Изражава се у милиметрима.
bio18	Количина падавина у току најтоплијег квартала - квартални индекс који апроксимира тоталну количину преципитације током најтоплијег периода. Изражава се у милиметрима.
bio19	Количина падавина у току најхладнијег квартала - квартални индекс који апроксимира тоталну количину преципитације током најхладнијег периода. Изражава се у милиметрима.

10.3. Прилог 3

Табела ПЗ. Листа узорака анализираних применом *ddRAD-seq* приступа, уз информације о продукованим секвенцама и *ddRAD* локусима.

Узорак	Врста	Укупан број очитаних секвенци	Број филтрираних секвенци	Број дефинисаних кластера	Просечна дубина секвенцирања	Број филтрираних консезус кластера	Број локуса у матрици секвенци
AU1831	<i>M. portschinsyi</i>	10 180 154	10 106 184	781 250	51,05	13 0827	2 575
AU1821	<i>M. ruficornis</i>	3 505 122	3 470 247	243 788	26,48	39 576	2 223
AU1822	<i>M. ruficornis</i>	2 961 332	2 935 038	239 259	23,65	35 665	2 108
RU210	<i>M. ruficornis</i>	11 768 142	11 671 601	855 842	56,96	56 494	2 581
RU425	<i>M. ruficornis</i>	24 828 376	24 723 971	1 465 160	116,32	60 937	2 540
RU351	<i>M. hoplitis</i>	2 124 616	2 108 761	192 653	21,98	27 740	1 686
RU254	<i>M. trebevicensis</i>	9 746 618	9 668 007	767 408	48,65	51 187	2 480
RU255	<i>M. trebevicensis</i>	12 233 838	12 117 502	995 144	52,66	53 300	2 543
FIN27	<i>M. trebevicensis</i>	27 675 830	27 562 536	1 357 524	120,61	64 078	2 537
RU318	<i>M. trebevicensis</i>	47 174	44 582	-		-	-
RU198	<i>M. trispinus</i>	10 832 856	10 760 049	828 998	58,44	50 097	2 454
RU86	<i>M. armipes</i>	22 195 376	22 076 463	1 521 243	98,31	61 046	2 726
RU87	<i>M. armipes</i>	14 954 536	14 872 766	1 059 489	73,26	57 127	2 707
RU41	<i>M. trebevicensis</i>	6 536 310	6 500 422	493 343	41,6	40 725	2 315
RU43	<i>M. trebevicensis</i>	16 463 246	16 366 7186	983 469	81,62	54 800	2 615
RUT1	<i>M. trebevicensis</i>	1 155 028	1 146 900	88 502	15,58	20 190	1 591
RUT3	<i>M. trebevicensis</i>	4 394 808	4 369 051	296 264	34,83	36 988	2 134
RUT4	<i>M. trebevicensis</i>	49 602	49 059	-		-	-
AU1823	<i>M. armipes</i>	6 053 488	6 006 444	298 286	44,83	44 791	2 500
AU1824	<i>M. armipes</i>	5 159 292	5 127 948	303 448	39,94	41 095	2 380
RU45	<i>M. trebevicensis</i>	12 657 474	12 595 154	878 405	67,76	48 745	2 526
RU46	<i>M. trebevicensis</i>	14 066 766	13 995 760	901 552	71,35	51 636	2 576
RU47	<i>M. trebevicensis</i>	12 265 054	12 181 590	689 383	69,71	50 743	2 579
RU48	<i>M. trebevicensis</i>	7 133 676	7 099 394	413 152	48,95	41 679	2 430
RU50	<i>M. trebevicensis</i>	22 158 512	22 070 074	1 334 179	97,5	60 043	2 626

RU444	<i>M. ilgazenze</i>	12 674 838	12 614 231	934 610	69,28	50 164	2 353
RU445	<i>M. ovaloides</i>	12 707 372	12 641 413	870 631	70,2	51 176	2 454
RU201	<i>M. acutus</i>	3 091 720	3 078 226	344 502	27,04	24 877	1 572
RU433	<i>M. ovaloides</i>	15 749 578	15 662 979	1 182 212	75,31	54 786	2 485
RU447	<i>M. auripes</i>	22 718 474	22 614 473	1 341 821	120,07	5 5693	2 505
RU452	<i>M. auripes</i>	2 496 428	2 481 571	235 224	21,94	30 803	1 874
RU70	<i>M. auripes</i>	14 021 356	13 947 424	776 419	82,18	52 724	2 557
RU71	<i>M. auripes</i>	3 884 900	3 869 877	345 989	34,6	29 288	1 751
RU77	<i>M. auripes</i>	14 658 316	14 580 695	890 857	80,07	52 389	2 495
RU78	<i>M. auripes</i>	1 2568 888	12 483 916	780 818	70,91	50 625	2 471
AU1828	<i>M. auripes</i>	20 757 164	20 654 271	1 363 565	97,89	58 398	2 477
RU67	<i>M. auripes</i>	8 933 080	8 876 729	619 195	52,46	48 930	2 386
RU69	<i>M. auripes</i>	513 344	494 773	84 218	12,72	4 723	970
RU58	<i>M. auripes</i>	18 003 294	17 893 408	1 369 581	79,63	56 875	2 562
RU56	<i>M. auripes</i>	11 526 874	11 474 393	697 159	67,47	51 491	2 528
RU421	<i>M. auripes</i>	11 730 122	11 681 251	682 951	72,24	49 662	2 413
RU422	<i>M. auripes</i>	14 569 794	14 506 438	1 036 449	76,24	52 754	2 451
RU63	<i>M. auripes</i>	10 875 042	10 802 494	769 034	61,55	50 480	2 449
RU65	<i>M. auripes</i>	1 907 680	1 877 830	193 307	15,92	30 611	1 977
AU959	<i>M. papillus</i>	16 509 440	16 431 688	901 814	88,88	57 273	2 506
AU960	<i>M. papillus</i>	24 127 634	24 008 123	1 513 147	110,72	61 719	2 536
RU182	<i>M. papillus</i>	16 415 202	16 321 427	1 131 937	81,76	56 958	2 523
RU183	<i>M. papillus</i>	12 330 934	12 253 913	671 321	68,73	55 886	2 512
RU184	<i>M. papillus</i>	1 658 436	16 494 879	1 089 248	81,41	58 515	2 547
RU398	<i>M. papillus</i>	17 937 226	17 843 308	1 235 021	90,58	55 815	2 455
RU439	<i>M. loewi</i>	29 598 270	29 414 917	2 378 083	99,28	69 692	2 592
RU441	<i>M. loewi</i>	39 229 568	39 029 799	3 007 388	128,31	71 905	2 544
RU411	<i>M. loewi</i>	171 802	170 728	-	-	-	-
RU410	<i>M. loewi</i>	4 143 672	4 122 854	241 716	34,91	38 511	2 132
RU412	<i>M. loewi</i>	1 890 452	1 879 415	154 613	19,83	27 394	1 784
RU415	<i>M. loewi</i>	8 339 570	8 301 416	496 466	56,7	46 005	2 340

RU416	<i>M. loewi</i>	910 334	905 661	65 700	13,19	20 707	1 581
RU434	<i>M. armipes</i>	14 015 302	13 933 350	928 111	76,5	52 156	2 600
RU465	<i>M. armipes</i>	17 378 552	17 246 578	1 331 911	81,69	55 455	2 588
RU467	<i>M. armipes</i>	23 131 584	23 014 452	1 527 035	109,09	59 444	2 605
RU468	<i>M. armipes</i>	22 815 148	22 692 946	1 482 944	106,41	59 245	2 604
RU471	<i>M. armipes</i>	25 811 982	25 676 547	1 583 878	122,3	60 181	2 588
RU472	<i>M. armipes</i>	33 597 670	33 398 857	2 051 951	139,9	64 285	2 649
RU180	<i>M. loewi</i>	3 616 030	3 597 743	245 536	33,89	29 937	1 887
RU135	<i>M. loewi</i>	17 607 754	17 494 227	963 439	88,8	59 820	2 651
RU138	<i>M. loewi</i>	14 003 824	13 903 178	1 025 280	66,83	55 567	2 602
RU142	<i>M. loewi</i>	8 826 204	5 758 856	578 915	52,59	48 485	2 535
RU173	<i>M. loewi</i>	9 451 076	9 401 033	572 499	55,84	51 255	2 546
RU150	<i>M. loewi</i>	8 822 518	8 763 765	488 880	56,54	49 717	2 516
RU116	<i>M. loewi</i>	22 758 864	22 624 934	1 406 427	102,27	63 028	2 647
RU128	<i>M. loewi</i>	16 227 934	16 114 302	859 805	81,34	61 324	2 653
AU957	<i>M. loewi</i>	24 675 166	24 549 087	1 682 682	102,35	65 629	2 668
AU954	<i>M. loewi</i>	27 966 080	27 824 430	1 799 358	111,44	68 151	2 667
AU955	<i>M. loewi</i>	5 478 758	5 454 114	426 934	41,6	36 852	1 974
RU90	<i>M. armipes</i>	19 649 056	19 520 885	1 432 743	83,7	62 629	2 749
RU94	<i>M. armipes</i>	24 402 512	24 284 544	1 641 126	103,51	64 947	2 749
RU115	<i>M. armipes</i>	22 486 364	22 365 387	1 448 032	99,45	63 537	2 744
RU82	<i>M. armipes</i>	15 244 426	15 155 632	824 692	78,4	58 964	2 742
RU103	<i>M. armipes</i>	15 081 966	14 960 331	878 307	73,73	60 285	2 718
RU101	<i>M. armipes</i>	28 234 178	28 058 051	2 013 583	106,12	68 719	2 732
RU106	<i>M. armipes</i>	17 665 448	17 562 958	1 278 281	78,27	60 555	2 727
RU85	<i>M. armipes</i>	4 361 886	4 341 265	412 222	33,79	33 526	2 005
RU217	<i>M. armipes</i>	18 880 928	18 751 252	1 406 239	82,6	60 219	2 709
RU223	<i>M. armipes</i>	10 400 186	10 329 488	759 013	54,26	53 180	2 667
AU1835	<i>M. ruficornis</i>	71 444	70 830	-	-	-	-
AU1830	<i>M. portschinskyi</i>	15 003 974	14 924 042	974 224	73,71	56 072	2 587
RU185	<i>M. hoplitis</i>	13 984 684	13 894 496	818 609	88,54	49 566	2 386

Генетички диверзитет *Merodon ruficornis* групе (Diptera: Syrphidae)

RU44	<i>M. trebevicensis</i>	10 977 932	10 898 839	857 865	50,93	53 141	2 497
RU197	<i>M. trispinus</i>	5 821 140	5 781 016	448 947	40,71	40 018	2 270
RU448	<i>M. armipes</i>	11 332 350	11 607 587	840 421	68,49	48 520	2 517
RU449	<i>M. armipes</i>	1 634 902	1 623 753	184 616	16,56	24 606	1 720
AU189	<i>M. luteofasciatus</i>	15 861 296	15 800 102	1 5726 579	77,8	52 904	1 586
AU1831	<i>M. portschinskyi</i>	10 180 154	10 106 184	781 250	51,05	13 0827	2 575

10.4. Прилог 4

Табела П4. Приказ вредности некоригованих просечних генетичких дистанци (p - *uncorrected pairwise distance*) заснованих на секвенцама комбинованих 3' и 5' фрагмента митохондријског *COI* гена између парова врста и / или популација унутар *Merodon ruficornis* групе.

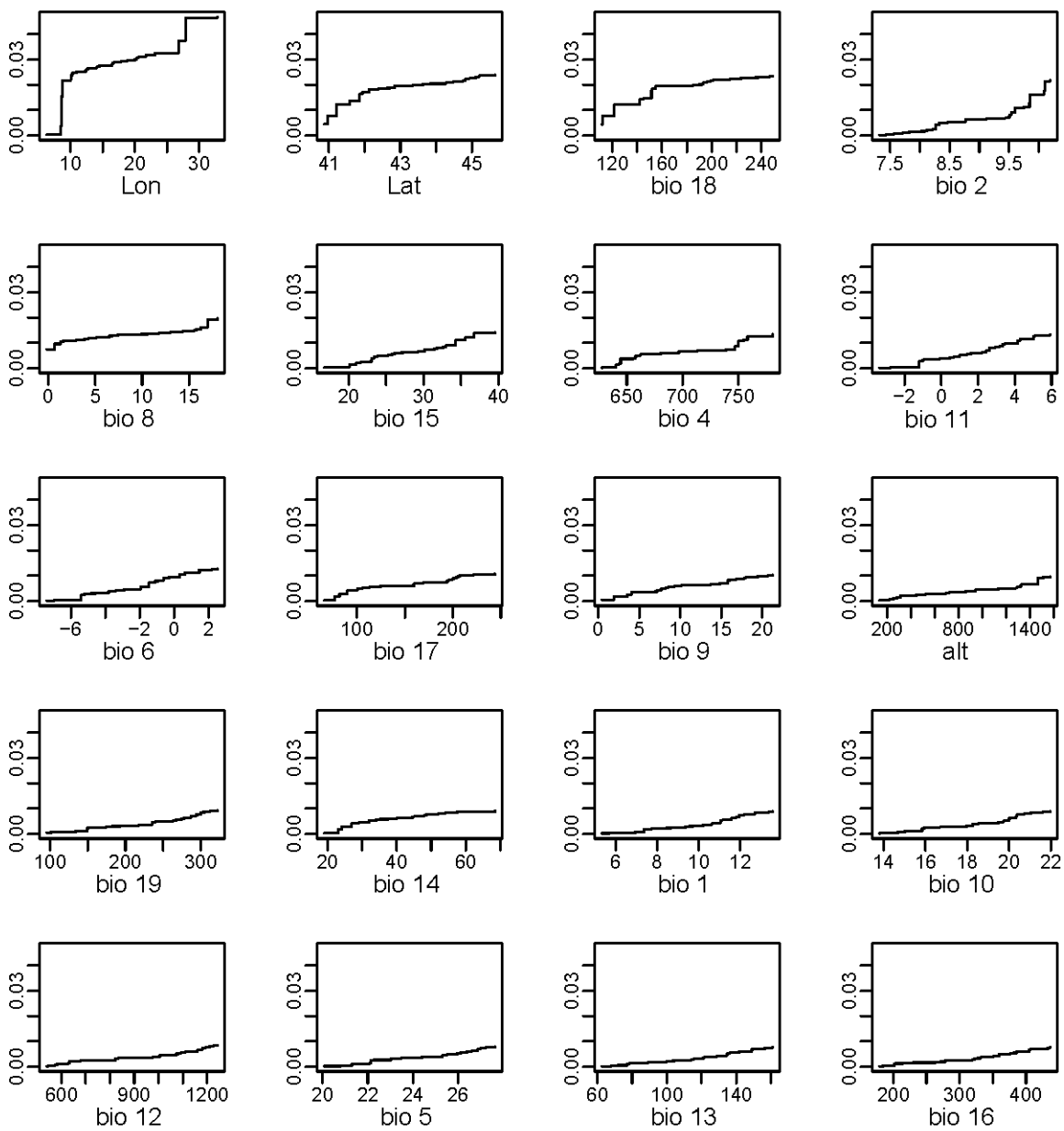
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1. <i>M. trebevicensis</i> Балкан — Дубашница																							
2. <i>M. auripes</i> Балкан	0,0268																						
3. <i>M. auripes</i> Анадолија	0,0249	0,0144																					
4. <i>M. armipes</i> Балкан	0,0281	0,0179	0,014																				
5. <i>M. loewi</i> Балкан	0,0277	0,0177	0,0137	0,0007																			
6. <i>M. loewi</i> Анадолија — Егејска регија	0,03	0,017	0,0148	0,0112	0,011																		
7. <i>M. loewi</i> Анадолија — Средоземна регија	0,0267	0,0166	0,0126	0,002	0,0018	0,0101																	
8. <i>M. hoplitis</i>	0,0221	0,0282	0,0276	0,0295	0,0292	0,0315	0,0282																
9. <i>M. trispinus</i>	0,0294	0,0321	0,0318	0,0337	0,0334	0,0327	0,0326	0,0244															
10. <i>M. papillus</i>	0,0245	0,0158	0,0118	0,0082	0,008	0,0109	0,0071	0,0288	0,0332														
11. <i>M. fulvitaris</i>	0,0265	0,0164	0,0123	0,0074	0,0072	0,0101	0,0063	0,0294	0,0322	0,0067													
12. <i>M. trebevicensis</i> Анадолија	0,0097	0,0257	0,024	0,0271	0,0268	0,0276	0,0258	0,0241	0,0277	0,0249	0,0256												
13. <i>M. acutus</i>	0,0262	0,016	0,0121	0,0129	0,0126	0,0144	0,0115	0,026	0,0318	0,0107	0,0128	0,0238											
14. <i>M. gallicus</i>	0,0506	0,0525	0,0487	0,0549	0,0546	0,0539	0,0534	0,0476	0,0486	0,0528	0,0541	0,0475	0,0501										
15. <i>M. ruficornis</i>	0,0386	0,0386	0,0338	0,0413	0,0409	0,0414	0,04	0,0379	0,042	0,0392	0,0383	0,0364	0,0409	0,0493									
16. <i>M. armipes</i> Западна Европа и Апенинско полуострво	0,0082	0,0251	0,0225	0,0257	0,0253	0,0281	0,0243	0,0218	0,027	0,0235	0,0241	0,0073	0,0252	0,0471	0,0333								
17. <i>M. portschinskyi</i>	0,0324	0,0339	0,0291	0,0366	0,0362	0,036	0,0353	0,0351	0,038	0,0345	0,0336	0,03	0,0347	0,0519	0,0363	0,0281							
18. <i>M. loewi</i> Егејски архипелаг — Лезбос	0,0251	0,0164	0,0124	0,0088	0,0086	0,0115	0,0077	0,0294	0,0338	0,0009	0,0073	0,0256	0,0113	0,0534	0,0398	0,0241	0,0351						
19. <i>M. trebevicensis</i> Балкан — Голија, Проклетије, Олимп	0,0307	0,0316	0,0326	0,0361	0,0358	0,0333	0,0354	0,0287	0,0285	0,0332	0,0338	0,0291	0,0323	0,0561	0,0432	0,0281	0,0404	0,0338					
20. <i>M. lamellatus</i>	0,0251	0,0149	0,011	0,0074	0,0071	0,0101	0,0063	0,028	0,0323	0,0009	0,0058	0,0241	0,0099	0,0519	0,0383	0,0227	0,0336	0,0015	0,0323				
21. <i>M. ovaloides</i>	0,0291	0,0171	0,0136	0,0168	0,0165	0,0179	0,0155	0,0309	0,0356	0,0151	0,0158	0,0282	0,0149	0,0519	0,039	0,027	0,0348	0,0156	0,036	0,0143			
22. <i>M. ilgazenze</i>	0,0255	0,0165	0,01	0,0162	0,0161	0,0192	0,0163	0,0289	0,0319	0,0155	0,0161	0,0239	0,0152	0,05	0,0349	0,0241	0,0317	0,0161	0,0304	0,0146	0,0182		
23. <i>M. loewi</i> Анадолија — Црноморска регија	0,0243	0,0157	0,0117	0,0081	0,0078	0,0108	0,007	0,0287	0,0331	0,0001	0,0066	0,0249	0,0106	0,0526	0,039	0,0234	0,0344	0,0007	0,0331	0,0007	0,015	0,0154	
24. <i>M. armipes</i> Анадолија	0,0253	0,0165	0,0119	0,0093	0,009	0,0119	0,0082	0,0293	0,0338	0,0019	0,0078	0,0258	0,0115	0,0519	0,0396	0,0243	0,0349	0,0025	0,034	0,0024	0,0145	0,0159	0,0018

10.5 Прилог 5

Табела П5. Приказ вредности некоригованих просечних генетичких дистанци (p - *uncorrected pairwise distance*) заснованих на секвенцама 5' фрагмента митохондријског *COI* гена између парова врста и / или популација унутар *Merodon ruficornis* групе.

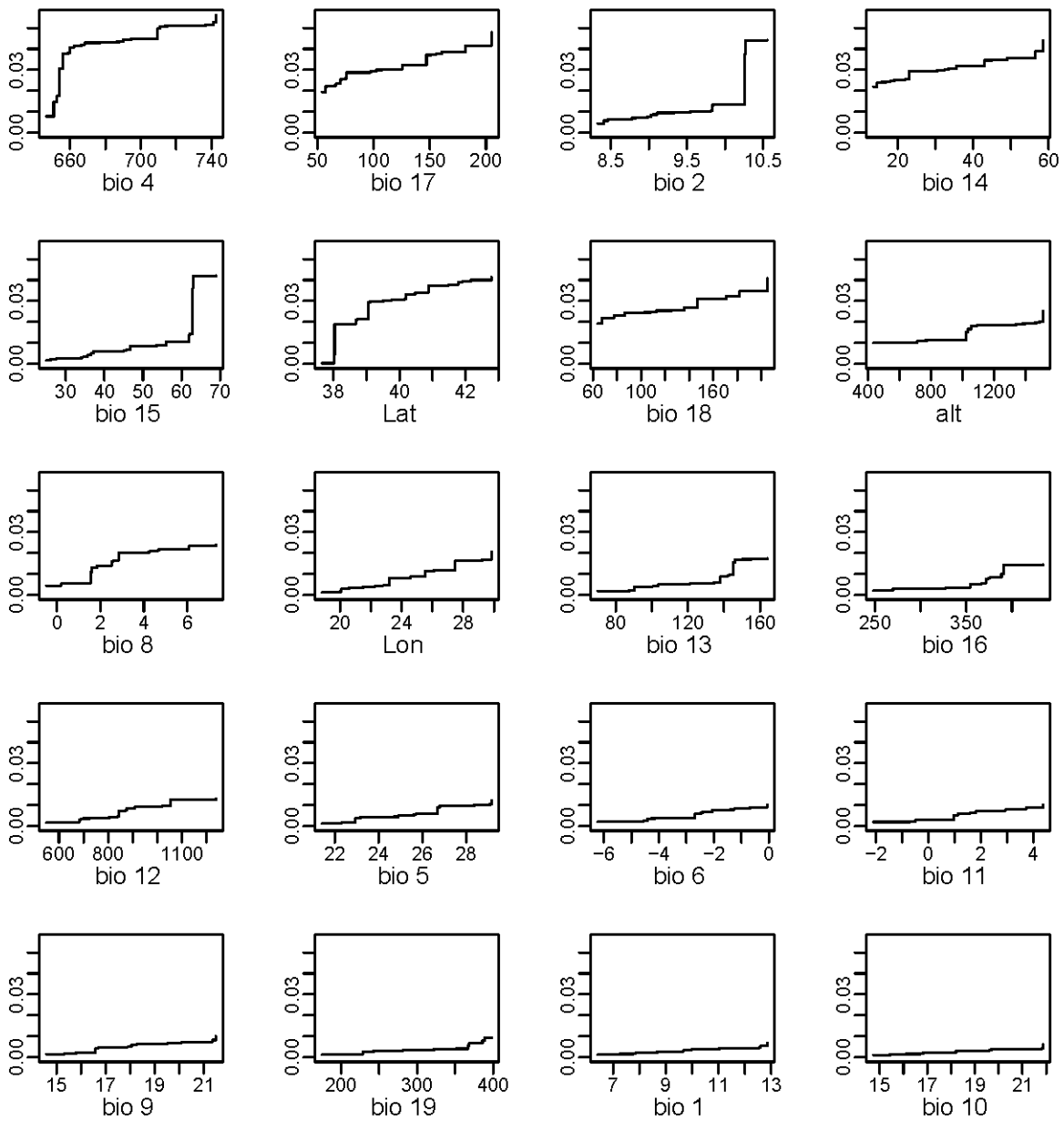
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29		
1. <i>M. trebevicensis</i> Балкан — Дубашница																															
2. <i>M. auripes</i> Балкан	0,0214																														
3. <i>M. auripes</i> Анадолија	0,0234	0,0062																													
4. <i>M. auripes</i> Украјина — Одешка Област	0,0214	0,0003	0,0059																												
5. <i>M. auripes</i> Украјина — Запорошка Област	0,0263	0,0085	0,0042	0,0082																											
6. <i>M. armipes</i> Балкан	0,0296	0,0149	0,0134	0,0147	0,0163																										
7. <i>M. armipes</i> Украјина	0,0304	0,0157	0,0142	0,0155	0,0171	0,0008																									
8. <i>M. loewi</i> Балкан	0,0296	0,0149	0,0134	0,0147	0,0163	0	0,0008																								
9. <i>M. loewi</i> Анадолија — Егејска регија	0,0333	0,0185	0,0167	0,0184	0,02	0,0126	0,0135	0,0126																							
10. <i>M. loewi</i> Анадолија — Средоземна регија	0,0301	0,0153	0,0138	0,0151	0,0163	0,0009	0,0013	0,0009	0,0136																						
11. <i>M. hoplitis</i>	0,0231	0,0243	0,026	0,0242	0,0289	0,0294	0,0302	0,0294	0,0363	0,0298																					
12. <i>M. trispinus</i>	0,0304	0,0254	0,0269	0,0253	0,0302	0,0273	0,0281	0,0273	0,031	0,0282	0,0218																				
13. <i>M. papillus</i>	0,028	0,0165	0,015	0,0163	0,0179	0,0082	0,009	0,0082	0,0143	0,0091	0,0343	0,0322																			
14. <i>M. fulvitaris</i>	0,0296	0,0149	0,0131	0,0147	0,0163	0,0065	0,0073	0,0065	0,0126	0,0075	0,0326	0,0306	0,0082																		
15. <i>M. trebevicensis</i> Анадолија	0,0133	0,0213	0,0232	0,0212	0,0261	0,0294	0,0302	0,0294	0,0298	0,0298	0,0228	0,0265	0,031	0,0294																	
16. <i>M. loewi</i> Украјина	0,0312	0,0165	0,015	0,0163	0,0179	0,0016	0,0024	0,0016	0,0143	0,0026	0,031	0,029	0,0098	0,0082	0,031																
17. <i>M. acutus</i>	0,0304	0,0157	0,0142	0,0155	0,0171	0,0171	0,0179	0,0171	0,0208	0,0176	0,0269	0,0277	0,0188	0,0204	0,0269	0,0188															
18. <i>M. gallicus</i>	0,0524	0,0426	0,0424	0,0424	0,0424	0,0489	0,0498	0,0489	0,0493	0,0489	0,0475	0,0498	0,0506	0,0506	0,0457	0,0506	0,0432														
19. <i>M. ruficornis</i>	0,0337	0,0266	0,0251	0,0264	0,0281	0,0313	0,0321	0,0313	0,0374	0,0318	0,0335	0,0354	0,033	0,0313	0,0307	0,033	0,0354	0,0476													
20. <i>M. armipes</i> Западна и Средња Европа	0,0117	0,0196	0,0183	0,0196	0,0212	0,0245	0,0253	0,0245	0,0306	0,0249	0,0207	0,0253	0,0261	0,0245	0,0082	0,0261	0,0285	0,044	0,0225												
21. <i>M. portschinskyi</i>	0,0361	0,0311	0,0297	0,031	0,0326	0,0392	0,04	0,0392	0,0404	0,0396	0,0354	0,0367	0,0408	0,0392	0,0326	0,0408	0,04	0,0522	0,0284	0,0277											
22. <i>M. loewi</i> Егејски архипелаг — Лезбос с	0,028	0,0165	0,015	0,0163	0,0179	0,0082	0,009	0,0082	0,0143	0,0091	0,0343	0,0322	0	0,0082	0,031	0,0098	0,0188	0,0506	0,033	0,0261	0,0408										
23. <i>M. trebevicensis</i> Балкан — Голија, Проклетије, Олимп	0,0342	0,024	0,0258	0,0238	0,0274	0,0339	0,0347	0,0339	0,0324	0,0342	0,0307	0,0279	0,0356	0,0339	0,0287	0,0356	0,0295	0,0502	0,0375	0,029	0,0388	0,0356									
24. <i>M. trebevicensis</i> Украјина	0,0345	0,0262	0,0277	0,0261	0,031	0,0343	0,0351	0,0343	0,0347	0,0347	0,031	0,0285	0,0359	0,0343	0,031	0,0359	0,0318	0,0538	0,0316	0,0294	0,0359	0,0359	0,0082								
25. <i>M. armipes</i> Апенинско полуострво	0,01	0,0211	0,0232	0,0212	0,0261	0,0294	0,0302	0,0294	0,033	0,0298	0,0224	0,0269	0,031	0,0294	0,0098	0,031	0,0302	0,0457	0,0281	0,0082	0,031	0,031	0,029	0,0294							
26. <i>M. lamellatus</i>	0,0296	0,0149	0,0134	0,0147	0,0163	0,0065	0,0073	0,0065	0,0126	0,0075	0,0326	0,0306	0,0016	0,0065	0,0294	0,0082	0,0171	0,0489	0,0313	0,0245	0,0392	0,0016	0,0339	0,0343	0,0294						
27. <i>M. ovaloides</i>	0,0296	0,0149	0,0112	0,0147	0,0141	0,0185	0,0193	0,0185	0,0211	0,019	0,0312	0,0324	0,0212	0,0196	0,0294	0,0201	0,0193	0,0464	0,0313	0,0256	0,0359	0,0212	0,0336	0,0339	0,0294	0,0196					
28. <i>M. ilgazenze</i>	0,0258	0,009	0,0078	0,0087	0,0103	0,0158	0,0166	0,0158	0,0194	0,0162	0,0288	0,0296	0,0174	0,0158	0,0256	0,0174	0,0166	0,0484	0,0308	0,0239	0,0353	0,0174	0,0256	0,0272	0,0256	0,0158	0,0158				
29. <i>M. trebevicensis</i> Анадолија	0,028	0,0165	0,015	0,0163	0,0179	0,0082	0,009	0,0082	0,0143	0,0091	0,0343	0,0322	0	0,0082	0,031	0,0098	0,0188	0,0506	0,033	0,0261	0,0408	0	0,0356	0,0359	0,031	0,0016	0,0212	0,0174			
30. <i>M. armipes</i> Анадолија	0,0282	0,017	0,0154	0,0168	0,0184	0,0084	0,0092	0,0084	0,0147	0,0093	0,0343	0,0325	0,0005	0,0085	0,0315	0,01	0,019	0,0507	0,0334	0,0266	0,0412	0,0005	0,036	0,0364	0,0315	0,0021	0,0216	0,0179	0,0005		

10.6. Прилог 6



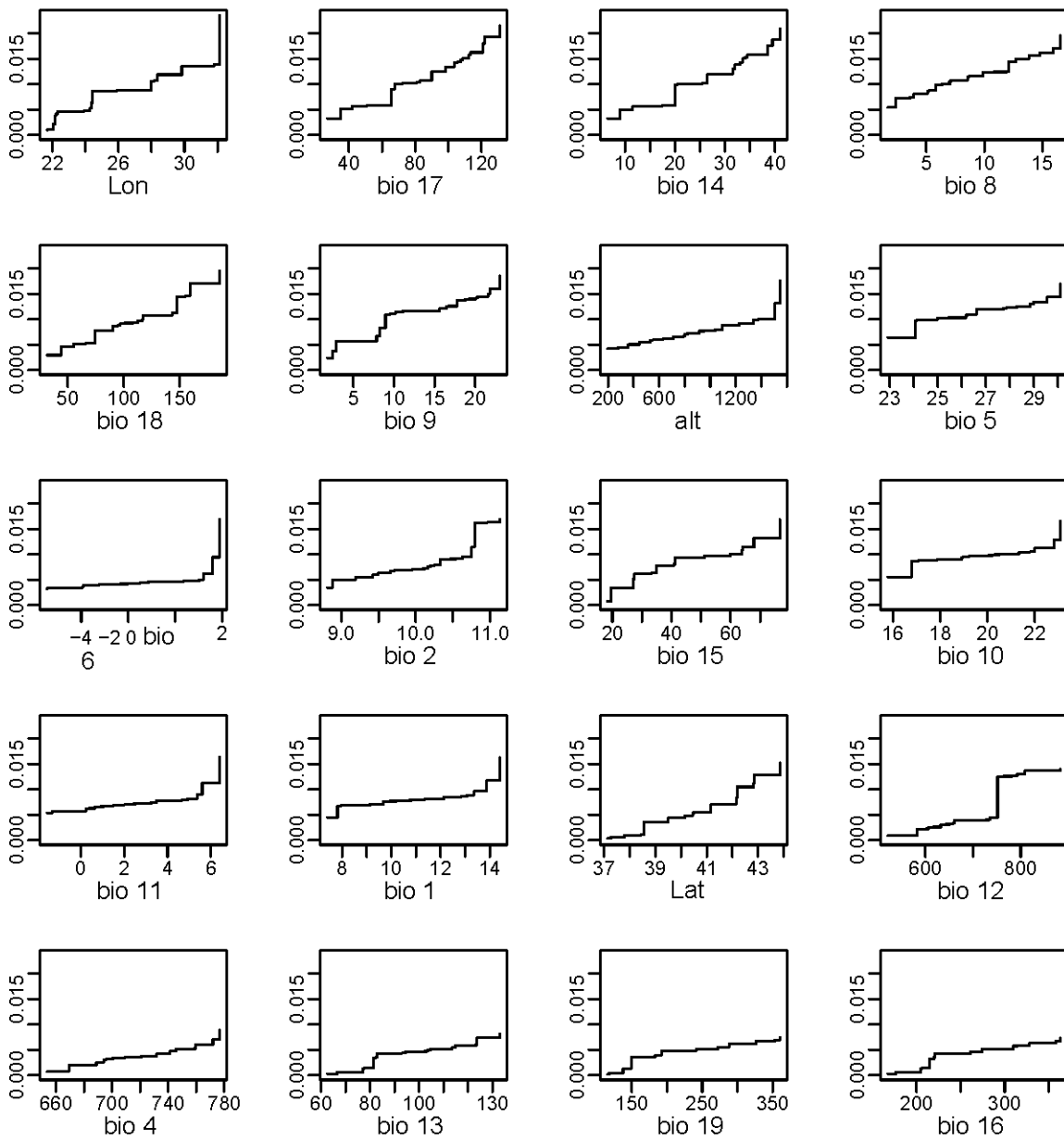
Слика П6. Кумулативна важност утицаја градијента вредности појединачних срединских карактеристика на промене у учесталости алела код *Merodon armipes* врсте.

10.7. Прилог 7



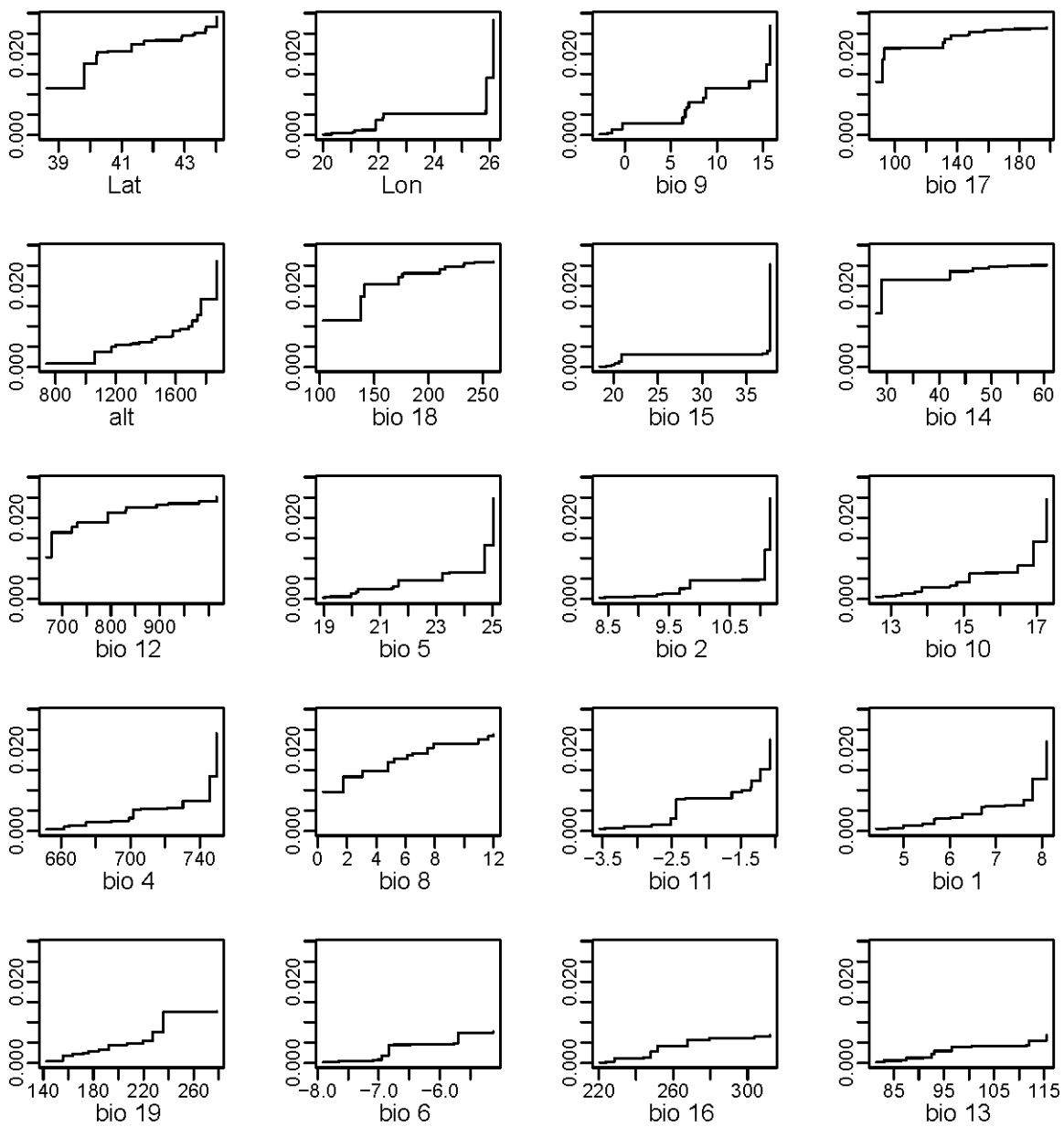
Слика П7. Кумулативна важност утицаја градијента вредности појединачних срединских карактеристика на промене у учесталости алела код *Merodon auripes* врсте.

10.8. Прилог 8



Слика П8. Кумулативна важност утицаја градијента вредности појединачних срединских карактеристика на промене у учесталости алела код *Merodon loewi* врсте.

10.9. Прилог 9



Слика П9. Кумулативна важност утицаја градијента вредности појединачних срединских карактеристика на промене у учесталости алела код *Merodon trebevicensis* врсте.

Биографија



Ива Горше је рођена 10. децембра 1994. године у Новом Саду, где је завршила Гимназију “Светозар Марковић”. Основне академске студије је похађала на Природно-математичком факултету у Новом Саду, Департман за биологију и екологију, смер Биолог, модул молекуларни биолог. Дипломирала је 2017. године са просечном оценом 9,79. након чега на истом факултету уписује дипломске академске студије Мастер биолог, модул Молекуларни биолог, које завршава 2018. године са просечном оценом 10,00. Исте године на Природно-математичком факултету у Новом Саду, Департман за биологију

и екологију, уписује докторске академске студије из научне области Биологија (ужа научна област Генетика). Све предвиђене испите на докторским студијама положила је просечном оценом 10,00. Током основних и мастер академских студија била је стипендиста Министарства просвете и спорта Републике Србије, као и Министарства омладине и спорта и добитница многих факултетских и универзитетских награда. Звање истраживач приправник стиче у 2019. години, након чега се запошљава на Департману за Биологију и Екологију у оквиру Програма Министарства науке, технолошког развоја и иновација, док је у звање истраживача сарадника изабрана 2022. године. Оријентисана је на примену и развој нових молекуларних маркера од значаја за истраживање генетичке варијабилности и таксономије осоликих мува (Diptera: Syrphidae). Добитница је стипендије Synthesis програма EU за тему „Molecular tools for resolving taxonomic questions within the genus *Cheilisia* (Diptera: Syrphidae)“, у оквиру које је током 2022. године остварила истраживачку посету ДНК лабораторији Природњачког музеја, при Универзитету у Хелсинкију, Финска. Током 2023. године била је предавач на курсу интегративне таксономије осоликих мува, под називом „Integrative Taxonomic course on Syrphidae: Strengthening Taxonomic knowledge on pollinators“. У току докторских студија учествовала је у извођењу практичне наставе на Катедри за биохемију, молекуларну биологију и генетику. Учествовала је у реализацији 2 национална и 2 интернационална научно-истраживачка пројекта, а своје научне резултате је публиковала у оквиру 3 научна рада објављена у међународним часописима, једном раду у националном часопису и дванаест саопштења са скупова од међународног и националног значаја. Поред истраживачког рада, члан је Друштва генетичара Србије.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Генетички диверзитет <i>Merodon ruficornis</i> групе (Diptera: Syrphidae)
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, Департман за биологију и екологију
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
а) Програм научноистраживачког рада Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије (Ев. бр. 451-03-47/2023-01/200125)
б) Пројекат „Предлог стратегије за очување инсеката опрашивача у Србији – СПАС“ (Ев. бр. 7737504) финансиран од стране Фонда за науку Републике Србије у оквиру Програма Идеје
1. Опис података
1.1 Врста студије
<i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i>
У оквиру студије је, на основу анализе варијабилности постојећих и нових молекуларних алата, спроведено испитивање молекуларног диверзитета <i>Merodon ruficornis</i> групе осолених мува. Са тим у вези, генерисане су секвенце одабраних региона митохондријских и једарних генома, поред чега је применом ddRAD-seq методологије развијен сет геномских података од значаја за утврђивање диверзитета и таксономских односа унутар групе. На основу спроведених анализа, евалуирана је информативност примењених молекуларних алата у утврђивању таксономских граница и одређивању генетичког диверзитета унутар и између врста. Такође су на основу испитиваних маркера процењени филогенетски односи унутар групе. Методом коалесценције је процењено време диверзификације између различитих митохондријских линија, док је применом методе линеарног модела заснованог на дистанцама, као и <i>Gradient forest</i> приступа надгледаног машинског учења испитана улога срединских фактора у обликовању уоченог генетичког диверзитета. Поред тога је на основу анализе секвенци бактеријског 16S рРНК гена, тестирано присуство унутарћелијског симбионта из рода <i>Wolbachia</i> .
1.2 Врсте података
а) квантитативни
б) квалитативни
1.3. Начин прикупљања података
а) генотипови и хаплотипови врста осолених мува из <i>Merodon ruficornis</i> групе, који су дефинисани на основу генерисаних ДНК секвенци
б) текст , преглед доступне литературе релевантне за истраживање

в) мапа локалитета анализираних узорака, која је преузета из базе Департмана за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- a) Excel фајл, датотека .xlsx**
- b) SPSS фајл, датотека
- c) PDF фајл, датотека .pdf**
- d) Текст фајл, датотека .doc**
- e) JPG фајл, датотека .jpg
- f) Остало, датотека ..fas;.svg; .dbf; .shp**

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- a) број варијабли од 9 до 97 509 у зависности од методе.
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) се разликовао у зависности од примењене анализе.

1.3.3. Поновљена мерења

- a) да
- б) не**

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

- a) Да**
- б) Не

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- a) експеримент**, анализа варијабилности генерисаних секвенци једарног и митохондријског

генома.

б) анализа текста, подаци прикупљени из доступних литературних извора анализирани ради дефинисања циљева докторске дисертације, плана истраживања, као и дискутовања добијених резултата.

в) остало, теренско узорковање вршено ради прикупљања инсекатског материјала, као и прикупљања података о дистрибуцији *Merodon ruficornis* групе врста.

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

Програмски пакети за биоинформатичку обраду и анализу продукованих ДНК секвенци

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан применом биоинформатичких програмских пакета, коришћењем контролних експеримената и поређењем добијених резултата са доступним литературним подацима из релевантних извора.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података у матрицу је извршена поређењем добијених података са доступним литературним подацима.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму докторских дисертација у Универзитету у Новом Саду (CRIS) и Заједничком порталу свих докторских дисертација и извештаја комисија о њиховој оцени на универзитетима у Србији (NARDUS).

3.1.2. URL: адреса <https://www.cris.uns.ac.rs/index.jsf> и <https://nardus.mpn.gov.rs/>

3.1.3. DOI: /

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) **Да**

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

Докторска дисертација са прилогом ће бити депонована у Репозиторијуму докторских дисертација у Универзитету у Новом Саду (CRIS) и Заједничком порталу свих докторских дисертација и извештаја комисија о њиховој оцени на универзитетима у Србији (NARDUS).

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен?

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? Неограничено

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да **Не**

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

a) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално – без прераде

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Ива Горше; ivagorse@gmail.com; iva.gorse@dbe.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Ива Горше; ivagorse@gmail.com; iva.gorse@dbe.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Ива Горше; ivagorse@gmail.com; iva.gorse@dbe.uns.ac.rs