



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



Љиљана Шашић Зорић

Молекуларни диверзитет *Merodon aureus* групе (Diptera: Syrphidae)

-докторска дисертација-

Нови Сад, 2018.



UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY AND ECOLOGY



Ljiljana Šašić Zorić

Molecular diversity of *Merodon aureus* species group (Diptera: Syrphidae)

-PhD thesis-

Novi Sad, 2018.

Мојој породици у аманет...

Захвала

Најискреније се захваљујем проф. др Антеу Вујићу на неизмерној подршци, саветима, прикипљеном материјалу, а посебно на вери у мене и моје способности као младог истраживача. Хвала за позитивну енергију која ме је инспирисала и допринела да ово истраживање доведем крају. Такође, велико хвала и за сва будућа велика дела!

Неизмерно се захваљујем мојим менторкама проф др. Драгани Обрехт Видаковић због које сам заволела генетику, проф др. Михајли Ђан и др Gunilli Ståhls на корисним саветима, несебичној подршци и свему што су ме научиле. Хвала за пружену прилику!

Хвала мојим драгим колегама из Лабораторије за генетику, на дружењу и помоћи. Хвала др Невени Величковић на корисним саветима. Посебно хвала др Наташи Кочиш Тубић од које сам научила прве кораке о раду у генетичкој лабораторији, хвала за пријатељство и савете!

Велико хвала др Зорици Недељковић, др Јелени Ачански и др Марији Миличић на заједничком раду и дружењу. Хвала колегиници и будућој др Сањи Веселић, на дружењу, саветима и подршци!

Истраживање презентовано у овој докторској дисертацији урађено је у Лабораторији за генетику, Департамента за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду, али је део резултат сарадње са ДНК лабораторијом Природњачког музеја у Хелсинкију, Финска и др Gunillom Ståhls.

Захваљујем се Министарству просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије на финансиској подршци коју сам као стипендиста имала у периоду од 2007. до 2012. године.

На крају се захваљујем мојој породици на подршци, саветима, али пре свега што су увек били ту када је било тешко. Хвала мојој мајци што је умела да слуша и мом оцу што је увек веровао!

Хвала мом драгом супругу Мирку што је разумео и био подршка, што ми није дозволио да одустанем!

Нови Сад, 24.01.2018.

Љиљана Шашић Зорић

САДРЖАЈ

Листа табела.....	IV
Листа илустрација.....	VIII
1. Увод.....	1
2. Преглед литературе.....	3
2.1. <i>Merodon aureus</i> група (Diptera, Syrphidae)	3
2.2. Интегративни приступ у таксономији	6
2.3. Молекуларни маркери у таксономији	8
2.3.1. Митохондријални маркери и ДНК баркодинг.....	9
2.3.2. Митонуклеарна коадаптација и специјација.....	11
2.3.3. Нуклеарни рРНК гени	12
2.4. Таксономија криптичних врста	14
2.5. Одлике биодиверзитета Медитеранске регије.....	16
3. Циљеви.....	18
4. Радне хипотезе	19
5. Материја и методе.....	20
5.1. Материјал	20
5.2. Методе.....	21
5.2.1. Изолација геномске ДНК	21
5.2.2. Умножавање и секвенционирање митохондријалних и нуклеарних генских региона ДНК	22
5.2.3. Умножавање и детекција генетичке варијабилности применом ISSR маркера.....	24
5.2.4. Детекција <i>Wolbachia</i> инфекције.....	25
5.2.5. Обрада резултата	27
5.2.5.1. Израчунавање параметара молекуларног диверзитета	27
5.2.5.2. Конструкција мреже хаплотипова	28
5.2.5.3. Конструкција филогенетских стабала	29
5.2.5.4. Утврђивање граница између потенцијалних врста	32
5.2.5.5. Анализа ISSR профила.....	33
5.2.5.6. Анализа секвенци 16S рРНК гена и wsp гена <i>Wolbachia</i>	34

6. Резултати	35
6.1. <i>Merodon aureus</i> подгрупа	37
6.2. <i>Merodon caeruleus</i> комплекс	46
6.3. <i>Merodon cinereus</i> подгрупа	52
6.3.1. <i>Merodon cinereus</i> комплекс	52
6.3.2. <i>Merodon atratus</i> комплекс	58
6.3.3. <i>Merodon aerarius</i>	64
6.3.4. Варијабилност секвенци 28S рРНК гена у <i>Merodon cinereus</i> подгрупи	66
6.4. <i>Merodon bessarabicus</i> подгрупа	69
6.4.1. <i>Merodon luteomaculatus</i> комплекс	69
6.4.1.1. Анализа COI секвенци <i>Merodon luteomaculatus</i> комплекса.....	69
6.4.1.2. Анализа ISSR профила <i>Merodon luteomaculatus</i> комплекса	76
6.4.2. <i>Merodon bessarabicus</i>, <i>M. sapphous</i> и <i>M. ambiguus</i> комплекси	79
6.4.3. Варијабилност 28S рДНК секвенци у <i>Merodon bessarabicus</i> подгрупи	86
6.5. <i>Merodon chalybeus</i> комплекс	89
6.6. <i>Merodon dobrogensis</i> подгрупа	96
6.7. Диверзитет <i>Merodon aureus</i> групе	103
6.8. Дистрибуција COI хаплотипова <i>Merodon aureus</i> групе	108
6.9. Детекција присуства бактерија из рода <i>Wolbachia</i> у <i>Merodon aureus</i> групи	110
7. Дискусија	115
7.1. Процена молекуларног диверзитета <i>Merodon aureus</i> групе	115
7.2. Детекција <i>Wolbachia</i> инфекције и утицај на варијабилност COI гена	121
7.3. Молекуларни диверзитет у служби таксономије	123
8. Закључак	135
9. Литература	137
10. Прилози	152
10.1. Прилог 1	153
10.2. Прилог 2	175

10.3. Прилог 3	184
10.4. Прилог 4	187
10.5. Прилог 5	197
11. Extended abstract	198

Листа табела

Табела 1. Универзални прајмери коришћени за умножавање 3' и 5' региона COI гена и Д2-3 региона 28S рРНК гена код инсеката. / <i>Table 1. Universally conserved primers for amplification of 3' and 5' regions of COI gene and D2-3 region of 28S rRNA gene in insects.</i>	23
Табела 2. Секвенце коришћених wsp прајмера (Zhou и сар., 1998). / <i>Table 2. Sequences of used wsp primers (Zhou и сар., 1998).</i>	27
Табела 3. Списак врста коришћених као аутгрупе за конструкцију филогенетских стаба. / <i>Table 3. List of species used as outgroups for phylogenetic tree constructions.</i>	31
Табела 4. Некориговане просечне вредности дистанци (p - <i>uncorrected pairwise distance</i>) између парова врста <i>Merodon aureus</i> подгрупе. / <i>Table 4. Uncorrected pairwise distances between species pairs within Merodon aureus subgroup.</i>	40
Табела 5. Параметри генетичког полиморфизма за <i>Merodon aureus</i> подгрупу. / <i>Table 5. Parameters of genetic polymorphism of Merodon aureus subgroup.</i>	42
Табела 6. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена за <i>Merodon aureus</i> подгрупу. / <i>Table 6. List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of Merodon aureus subgroup.</i>	42
Табела 7. Вредности индекса фиксације (F_{ST}) између парова врста <i>Merodon aureus</i> подгрупе. / <i>Table 7. The values of fixation index between species pairs within Merodon aureus subgroup.</i>	44
Табела 8. Преглед генотипова 28S рРНК гена за <i>Merodon aureus</i> подгрупу. / <i>Table 8. List of 28S rRNA genotypes of Merodon aureus subgroup.</i>	45
Табела 9. Параметри генетичког полиморфизма за <i>Merodon caerulescens</i> комплекс. / <i>Table 9. Parameters of genetic polymorphism of Merodon caerulescens complex.</i>	49
Табела 10. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена за <i>Merodon caerulescens</i> комплекс. / <i>Table 10. List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of Merodon caerulescens complex.</i>	50
Табела 11. Преглед генотипова 28S рДНК за <i>Merodon caerulescens</i> комплекс. / <i>Table 11. List of combined 28S genotypes of Merodon caerulescens complex.</i>	51
Табела 12. Некориговане просечне вредности дистанци (p - <i>uncorrected pairwise distance</i>) између парова врста и/или потенцијалних врста <i>Merodon cinereus</i> комплекса. / <i>Table 12. Uncorrected pairwise distances between species and/or putative species pairs within Merodon cinereus complex.</i>	55
Табела 13. Параметри генетичког полиморфизма за <i>Merodon cinereus</i> комплекс. / <i>Table 13. Parameters of genetic polymorphism of Merodon cinereus complex.</i>	56
Табела 14. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена за <i>Merodon cinereus</i> комплекс. / <i>Table 14. List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of Merodon cinereus complex.</i>	57

Табела 15. Вредности индекса фиксације (F_{ST}) између парова врста и/или потенцијалних врста <i>Merodon cinereus</i> комплекса. / Table 14. The values of fixation index between species and/or supposed species pairs within <i>Merodon cinereus</i> complex.	58
Табела 16. Некориговане просечне вредности дистанци (p - <i>uncorrected pairwise distance</i>) између парова врста и/или потенцијалних врста <i>Merodon atratus</i> комплекса. / Table 16. <i>Uncorrected pairwise distances between species and/or supposed species pairs within Merodon atratus complex.</i>	61
Табела 17. Параметри генетичког полиморфизма за <i>Merodon atratus</i> комплекс. / Table 17. <i>Parameters of genetic polymorphism of Merodon atratus complex.</i>	62
Табела 18. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена за <i>Merodon atratus</i> комплекс. / Table 18. <i>List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of Merodon atratus complex.</i>	62
Табела 19. Вредности индекса фиксације (F_{ST}) између парова врста <i>Merodon atratus</i> комплекса. / Table 19. <i>The values of fixation index between species and/or supposed species pairs within Merodon atratus complex.</i>	63
Табела 20. Параметри генетичког полиморфизма врсте <i>Merodon aerarius</i> по регионима. / Table 20. <i>Parameters of genetic polymorphism of Merodon aerarius species for regions.</i>	64
Табела 21. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена врсте <i>Merodon aerarius</i> . / Table 21. <i>List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of Merodon aerarius.</i>	65
Табела 22. Вредности индекса фиксације (F_{ST}) између парова популација <i>Merodon aerarius</i> . / Table 22. <i>The values of fixation index between pairs of populations within Merodon aerarius.</i>	66
Табела 23. Преглед генотипова 28S рДНК за <i>Merodon cinereus</i> подгрупу. / Table 23. <i>List of 28S genotypes of Merodon cinereus subgroup.</i>	67
Табела 24. Некориговане просечне вредности дистанци (p - <i>uncorrected pairwise distance</i>) између парова врста <i>Merodon luteomaculatus</i> комплекса. / Table 24. <i>Uncorrected pairwise distances between species pairs within Merodon luteomaculatus complex.</i>	69
Табела 25. Параметри генетичког полиморфизма за <i>Merodon luteomaculatus</i> комплекс. / Table 25. <i>Parameters of genetic polymorphism of Merodon luteomaculatus complex.</i>	73
Табела 26. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена за <i>Merodon luteomaculatus</i> комплекс. / Table 26. <i>List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of Merodon luteomaculatus complex.</i>	74
Табела 27. Вредности индекса фиксације (F_{ST}) између парова врста <i>Merodon luteomaculatus</i> комплекса. / Table 27. <i>The values of fixation index between species pairs within Merodon luteomaculatus complex.</i>	74

Табела 28. Некориговане просечне вредности дистанци (p - <i>uncorrected pairwise distance</i>) између парова врста <i>Merodon bessarabicus</i> , <i>M. sapphous</i> и <i>M. ambiguus</i> комплекса. / <i>Table 28. Uncorrected pairwise distances between species pairs within Merodon bessarabicus, M. sapphous and M. ambiguus complex.</i>	82
Табела 29. Параметри генетичког полиморфизма за <i>Merodon bessarabicus</i> , <i>M. sapphous</i> и <i>M. ambiguus</i> комплексе. / <i>Table 29. Parameters of genetic polymorphism of Merodon bessarabicus, M. sapphous and M. ambiguus complexes.</i>	83
Табела 30. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена за <i>Merodon bessarabicus</i> , <i>M. sapphous</i> и <i>M. ambiguus</i> комплексе. / <i>Table 30. List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of Merodon bessarabicus, M. sapphous and M. ambiguus complexes.</i>	84
Табела 31. Вредности индекса фиксације (F_{ST}) између парова врста <i>Merodon bessarabicus</i> , <i>M. sapphous</i> и <i>M. ambiguus</i> комплекса. / <i>Table 31. The values of fixation index between species pairs within Merodon bessarabicus, M. sapphous and M. ambiguus complexes.</i>	86
Табела 32. Преглед генотипова 28S рДНК за <i>Merodon bessarabicus</i> подгрупу. / <i>Table 32. List of 28S genotypes of Merodon bessarabicus subgroup.</i>	87
Табела 33. Некориговане просечне вредности дистанци (p - <i>uncorrected pairwise distance</i>) између парова врста <i>Merodon chalybeus</i> комплекса. / <i>Table 33. Uncorrected pairwise distances between species pairs within Merodon chalybeus complex.</i>	89
Табела 34. Параметри генетичког полиморфизма за <i>Merodon chalybeus</i> комплекс. / <i>Table 34. Parameters of genetic polymorphism of Merodon chalybeus complex.</i>	92
Табела 35. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена за <i>Merodon chalybeus</i> комплекс. / <i>Table 35. List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of Merodon chalybeus complex.</i>	93
Табела 36. Вредности индекса фиксације (F_{ST}) између парова врста <i>Merodon chalybeus</i> комплекса. / <i>Table 36. The values of fixation index between species pairs within Merodon chalybeus complex.</i>	94
Табела 37. Преглед генотипова 28S рДНК за <i>Merodon chalybeus</i> комплекс. / <i>Table 37. List of 28S genotypes of Merodon chalybeus complex.</i>	94
Табела 38. Некориговане просечне вредности дистанци (p - <i>uncorrected pairwise distance</i>) између парова врста и/или потенцијалних врста <i>Merodon dobrogensis</i> подгрупе. / <i>Table 38. Uncorrected pairwise distances between species pairs within Merodon dobrogensis subgroup.</i>	96
Табела 39. Параметри генетичког полиморфизма за <i>Merodon dobrogensis</i> подгрупу. / <i>Table 39. Parameters of genetic polymorphism of Merodon dobrogensis subgroup.</i>	99

Табела 40. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена за <i>Merodon dobrogensis</i> подгрупе. / Table 40. List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of <i>Merodon dobrogensis</i> subgroup.	100
Табела 41. Вредности индекса фиксације (F_{ST}) између парова врста <i>Merodon dobrogensis</i> подгрупе. / Table 41. The values of fixation index between species pairs within <i>Merodon dobrogensis</i> subgroup.	101
Табела 42. Преглед генотипова 28S рДНК за <i>Merodon dobrogensis</i> подгрупу. / Table 42. List of 28S genotypes of <i>Merodon dobrogensis</i> subgroup.	101
Табела 43. Резултати тестирања на <i>Wolbachia</i> јединки припадника различитих врста <i>Merodon aureus</i> групе. / Table 43. The <i>Wolbachia</i> screening results of specimens which belong to different <i>Merodon aureus</i> group species.	111
Прилог 1: Табела П1. Списак узорака <i>Merodon aureus</i> групе са локалитетима узорковања. / Table P1. List of specimens of <i>Merodon aureus</i> group with sampling localities.	153
Прилог 4: Табела П1. Дистрибуција COI хаплотипова, врста, комплекса и подгрупа <i>Merodon aureus</i> групе по државама узорковања. / Table P1. The distribution of COI haplotypes, species, complexes and subgroups of <i>Merodon aureus</i> group accros the sampling countries.	188
Прилог 4: Табела П2. Преглед генотипова 28S рДНК за <i>Merodon aureus</i> групу. / Table P2. List of 28S genotypes of <i>Merodon aureus</i> group.	191
Прилог 5: Табела П1. Листа 16S секвенци <i>Wolbachia</i> А и В супергрупа присутних у инсекатским домаћинима. / Table P1. The list of <i>Wolbachia</i> 16S sequences representing A and B bacterial supergroups present in insect hosts.	197

Листа илустрација

- Слика 1. Положај *Merodon aureus* групе унутар класификационе шеме предложене у Šašić и сар. (2016). / *Figure 1. The placement of Merodon aureus group within the classification sheme proposed by Šašić et al. (2016).* 5
- Слика 2. Област узорковања са означеним локалитетима узорковања. / *Figure 2. Sampling area with marked sampling localities.* 20
- Слика 3. *Strict consensus* COI стабло од 13 једнаких стабала добијених анализом парсимоније за *Merodon aureus* подгрупу. Дужина: 715 корака, *Consistency index* (CI) 63, *Retention index* (RI) 86. *Bootstrap* вредности ≥ 50 приказане су поред чворова. Испуњени кругови представљају карактере који нису хомоплазије, празни кругови представљају хомоплазије. / *Figure 3. Strict consensus COI tree of 13 equally parsimonious trees of Merodon aureus subgroup. Length: 715 steps, Consistency index (CI) 63, Retention index (RI) 86. The bootstrap values ≥ 50 are indicated near nodes. Filled circles represent non-homoplasious characters, open circles are homoplasious characters.* 38
- Слика 4. *Maximum-likelihood* COI стабло за *Merodon aureus* подгрупу. *Bootstrap* вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / *Figure 4. Maximum-likelihood COI tree of Merodon aureus subgroup. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.* 39
- Слика 5. Утврђивање присуства баркод празнине (енг. *barcoding gap*) применом задатог опсега вредности дистанци унутар групе. А) *M. aureus* комплекс, некоригована р дистанца; Б) *Merodon aureus* комплекс, Т92+G; В) *M. unicolor* комплекс, некоригована р дистанца; Г) *M. unicolor* комплекс, Т92. / *Figure 5. Determination of barcoding gap presence by applying a given range of distance values within a group. A) M. aureus complex, uncorrected p distance; Б) Merodon aureus complex, T92+G; В) M. unicolor complex, uncorrected p distance; Г) M. unicolor complex, T92.* 41
- Слика 6. *Median-joining* мрежа COI хаплотипова *Merodon aureus* подгрупе. / *Figure 6. Median-joining network of COI haplotypes of Merodon aureus subgroup.* 43
- Слика 7. *Median-joining* мрежа 28S генотипова *Merodon aureus* подгрупе. / *Figure 7. Median-joining network of 28S genotypes of Merodon aureus subgroup.* 45
- Слика 8. *Strict consensus* COI стабло од 2 једнака стабала добијених анализом парсимоније за *Merodon caerulescens* комплекс. Дужина: 669 корака, *Consistency index* (CI) 64, *Retention index* (RI) 73. *Bootstrap* вредности ≥ 50 приказане су поред чворова. Испуњени кругови представљају карактере који нису хомоплазије, празни кругови представљају хомоплазије. / *Figure 8. Strict consensus COI tree of 2 equally parsimonious trees of Merodon caerulescens complex. Length: 669 steps, Consistency index (CI) 64, Retention index (RI) 73. The bootstrap values ≥ 50 are indicated near nodes. Filled circles represent non-homoplasious characters, open circles are homoplasious characters.* 47
- Слика 9. *Maximum-likelihood* COI стабло за *Merodon caerulescens* комплекс. *Bootstrap* вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / *Figure 9. Maximum-likelihood COI tree of Merodon caerulescens complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.* 48

Слика 10. Присуство баркод празнине (енг. <i>barcoding gap</i>) унутар <i>Merodon caerulescens</i> комплекса. / <i>Figure 10. The presence of the barcoding gap within Merodon caerulescens complex.</i>	49
Слика 11. <i>Median-joining</i> мрежа COI хаплотипова <i>Merodon caerulescens</i> комплекса. / <i>Figure 11. Median-joining network of COI haplotypes of Merodon caerulescens complex.</i>	50
Слика 12. <i>Median-joining</i> мрежа 28S генотипова <i>Merodon aureus</i> подгрупе. / <i>Figure 12. Median-joining network of 28S genotypes of Merodon aureus subgroup.</i>	51
Слика 13. <i>Strict consensus</i> COI стабло од 12 једнаких стабала добијених анализом парсимоније за <i>Merodon cinereus</i> комплекс. Дужина: 630 корака, <i>Consistency index</i> (CI) 65, <i>Retention index</i> (RI) 82. <i>Bootstrap</i> вредности ≥ 50 приказане су поред чворова. Испуњени кругови представљају карактере који нису хомоплазије, празни кругови представљају хомоплазије. / <i>Figure 13. Strict consensus COI tree of 12 equally parsimonious trees of Merodon cinereus complex. Length: 630 steps, Consistency index (CI) 65, Retention index (RI) 82. The bootstrap values ≥ 50 are indicated near nodes. Filled circles represent non-homoplasious characters, open circles are homoplasious characters.</i>	53
Слика 14. <i>Maximum-likelihood</i> COI стабло за <i>Merodon cinereus</i> комплекс. <i>Bootstrap</i> вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / <i>Figure 14. Maximum-likelihood COI tree of Merodon cinereus complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.</i>	54
Слика 15. Утврђивање присуства баркод празнине (енг. <i>barcoding gap</i>) <i>Merodon cinereus</i> комплекса применом задатог опсега вредности дистанци унутар групе. А), некоригована <i>p</i> дистанца; Б) <i>T92</i> . / <i>Figure 15. Determination of barcoding gap presence within Merodon cinereus complex by applying a given range of distance values within a group. A) uncorrected p distance; B) T92.</i>	55
Слика 16. <i>Median-joining</i> мрежа COI хаплотипова <i>Merodon cinereus</i> комплекса. / <i>Figure 16. Median-joining network of COI haplotypes of Merodon cinereus complex.</i>	57
Слика 17. <i>Strict consensus</i> COI стабло од 6 једнаких стабала добијених анализом парсимоније за <i>Merodon atratus</i> комплекс. Дужина: 620 корака, <i>Consistency index</i> (CI) 64, <i>Retention index</i> (RI) 78. <i>Bootstrap</i> вредности ≥ 50 приказане су поред чворова. Испуњени кругови представљају карактере који нису хомоплазије, празни кругови представљају хомоплазије. / <i>Figure 17. Strict consensus COI tree of 6 equally parsimonious trees of Merodon atratus complex. Length: 620 steps, Consistency index (CI) 64, Retention index (RI) 78. The bootstrap values ≥ 50 are indicated near nodes. Filled circles represent non-homoplasious characters, open circles are homoplasious characters.</i>	59
Слика 18. <i>Maximum-likelihood</i> COI стабло за <i>Merodon atratus</i> комплекс. <i>Bootstrap</i> вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / <i>Figure 18. Maximum-likelihood COI tree of Merodon atratus complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.</i>	60
Слика 19. Присуство баркод шупљине (енг. <i>barcoding gap</i>) унутар <i>Merodon atratus</i> комплекса. / <i>Figure 19. The presence of the barcoding gap within Merodon atratus complex.</i>	61

- Слика 20. *Median-joining* мрежа COI хаплотипова *Merodon atratus* комплекса. / *Figure 20. Median-joining network of COI haplotypes of Merodon atratus complex.* 63
- Слика 21. *Median-joining* мрежа COI хаплотипова врсте *Merodon aerarius*. / *Figure 21. Median-joining network of COI haplotypes of Merodon aerarius.* 65
- Слика 22. *Median-joining* мрежа 28S генотипова *Merodon cinereus* подгрупе. / *Figure 22. Median-joining network of 28S genotypes of Merodon cinereus subgroup.* 68
- Слика 23. *Strict consensus* COI стабло од 36 једнаких стабала добијених анализом парсимоније за *Merodon luteomaculatus* комплекс. Дужина: 722 корака, *Consistency index* (CI) 60, *Retention index* (RI) 85. *Bootstrap* вредности ≥ 50 приказане су поред чворова. Испуњени кругови представљају карактере који нису хомоплазије, празни кругови представљају хомоплазије. / *Figure 23. Strict consensus COI tree of 36 equally parsimonious trees of Merodon luteomaculatus complex. Length: 715 steps, Consistency index (CI) 60, Retention index (RI) 85. The bootstrap values ≥ 50 are indicated near nodes. Filled circles represent non-homoplasious characters, open circles are homoplasious characters.* 70
- Слика 24. *Maximum-likelihood* COI стабло за *Merodon luteomaculatus* комплекс. *Bootstrap* вредности ≥ 50 за главне класе приказане су поред чворова. / *Figure 24. Maximum-likelihood COI tree of Merodon luteomaculatus complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.* 71
- Слика 25. Утврђивање присуства баркод шупљине (енг. *barcoding gap*) применом задатог опсега вредности дистанци унутар *Merodon luteomaculatus* комплекса. А) некоригована *p* дистанца; Б) *T92+G*. / *Figure 25. Determination of barcoding gap presence by applying a given range of distance values within the Merodon luteomaculatus complex. A) uncorrected p distance; B) T92+G.* 72
- Слика 26. *Median-joining* мрежа COI хаплотипова *Merodon luteomaculatus* комплекса. / *Figure 26. Median-joining network of COI haplotypes of Merodon luteomaculatus complex.* 75
- Слика 27. ISSR профили врста *Merodon luteomaculatus* комплекса. / *Figure 27. ISSR profile of the Merodon luteomaculatus species complex.* 76
- Слика 28. ISSR UPGMA стабло *Merodon luteomaculatus* комплекса конструисано применом *Nei-Li* коефицијента генетичке дистанце. / *Figure. 28. ISSR UPGMA dendrogram of Merodon luteomaculatus complex constructed using the Nei-Li coefficient of genetic distance.* 77
- Слика 29. Генетичка структура између врста *Merodon luteomaculatus* комплекса одређена анализом ISSR профила. А) ΔK функција броја кластера; Б) Графички приказ генетичке структуре за $K=2$ и $K=5$. / *Figure 29. Genetic structure among species of the Merodon luteomaculatus complex resolved by ISSR profiles analysis. A) ΔK function of the number of clusters; B) The graphcal display of genetic structuring for $K=2$ and $K=5$.* 78
- Слика 30. *Strict consensus* COI стабло од 1716 једнаких стабала добијених анализом парсимоније за *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* и *M. ambiguus* комплексе. Дужина: 864 корака, *Consistency index* (CI) 56, *Retention index* (RI) 95. *Bootstrap* вредности ≥ 50 приказане су поред чворова. Испуњени кругови представљају карактере који нису хомоплазије, празни кругови представљају хомоплазије. /

- Figure 30. Strict consensus COI tree of 1716 equally parsimonious trees of *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* и *M. ambiguus* complexes. Length: 864 steps, Consistency index (CI) 56, Retention index (RI) 95. The bootstrap values ≥ 50 are indicated near nodes. Filled circles represent non-homoplasious characters, open circles are homoplasious characters. 80
- Слика 31. Maximum-likelihood COI стабло за *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* и *M. ambiguus* комплексе. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / Figure 31. Maximum-likelihood COI tree of *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* and *M. ambiguus* complexes. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes. 81
- Слика 32. Утврђивање присуства баркод шупљине (енг. *barcoding gap*) применом задатог опсега вредности дистанци унутар *Merodon ambiguus* комплекса. А) некоригована *p* дистанца; Б) T92+G. / Figure 32. Determination of barcoding gap presence by applying a given range of distance values within the *Merodon ambiguus* complexes. А) uncorrected *p* distance; Б) T92+G. 83
- Слика 33. Median-joining мрежа COI хаплотипова *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* и *M. ambiguus* комплексе. / Figure 33. Median-joining network of COI haplotypes of *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* and *M. ambiguus* complexes. 85
- Слика 34. Median-joining мрежа 28S генотипова *Merodon bessarabicus* подгрупе. / Figure 34. Median-joining network of 28S genotypes of *Merodon bessarabicus* subgroup. 88
- Слика 35. Strict consensus COI стабло 10 једнаких стабала добијених анализом парсимоније за *Merodon chalybeus* комплекс. Дужина: 719 корака, Consistency index (CI) 62, Retention index (RI) 87. Bootstrap вредности ≥ 50 приказане су поред чворова. Испуњени кругови представљају карактере који нису хомоплазије, празни кругови представљају хомоплазије. / Figure 35. Strict consensus COI tree of 10 equally parsimonious trees of *Merodon chalybeus* complex. Length: 719 steps, Consistency index (CI) 62, Retention index (RI) 87. The bootstrap values ≥ 50 are indicated near nodes. Filled circles represent non-homoplasious characters, open circles are homoplasious characters. 90
- Слика 36. Maximum-likelihood COI стабло за *Merodon chalybeus* комплекса. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / Figure 36. Maximum-likelihood COI tree of *Merodon chalybeus* complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes. 91
- Слика 37. Утврђивање присуства баркод празнине (енг. *barcoding gap*) применом задатог опсега вредности дистанци унутар *Merodon chalybeus* комплекса. А) некоригована *p* дистанца; Б) T92+G. / Figure 37. Determination of barcoding gap presence by applying a given range of distance values within the *Merodon chalybeus* complex. А) uncorrected *p* distance; Б) T92+G. 92
- Слика 38. Median-joining мрежа COI хаплотипова *Merodon chalybeus* комплекса. / Figure 38. Median-joining network of COI haplotypes of *Merodon chalybeus* complex. 93
- Слика 39. Median-joining мрежа 28S генотипова *Merodon chalybeus* комплекса. / Figure 39. Median-joining network of 28S genotypes of *Merodon chalybeus* complex. 95

- Слика 40. Стабло парсимоније *Merodon dobrogensis* подгрупе добијено анализом COI секвенци. Дужина: 715 корака, *Consistency index* (CI) 62, *Retention index* (RI) 87. *Bootstrap* вредности ≥ 50 приказане су изнад чворова. Испуњени кругови представљају карактере који нису хомоплазије, празни кругови представљају хомоплазије. / *Figure 40. Maximum parsimony tree of Merodon dobrogensis subgroup constructed using COI sequences. Length: 715 steps, Consistency index (CI) 62, Retention index (RI) 87. The bootstrap values ≥ 50 are indicated near nodes. Filled circles represent non-homoplasious characters, open circles are homoplasious characters.* 97
- Слика 41. *Maximum-likelihood* COI стабло за *Merodon dobrogensis* подгрупу. *Bootstrap* вредности ≥ 50 приказане су изнад чворова. / *Figure 41. Maximum-likelihood COI tree of Merodon dobrogensis subgroup. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.* 98
- Слика 42. Утврђивање присуства баркод шупљине (енг. *barcoding gap*) применом задатог опсега вредности дистанци унутар *Merodon dobrogensis* подгрупе. А) некоригована *p* дистанца; Б) T92+G. / *Figure 42. Determination of barcoding gap presence by applying a given range of distance values within the Merodon dobrogensis subgroup. A) uncorrected p distance; B) T92+G.* 99
- Слика 43. *Median-joining* мрежа COI хаплотипова *Merodon dobrogensis* подгрупе. / *Figure 43. Median-joining network of COI haplotypes of Merodon dobrogensis subgroup.* 100
- Слика 44. *Median-joining* мрежа 28S генотипова *Merodon dobrogensis* подгрупе. / *Figure 44. Median-joining network of 28S genotypes of Merodon chalybeus complex.* 102
- Слика 45. *Maximum-likelihood* COI стабло за *Merodon aureus* подгрупу. *Bootstrap* вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / *Figure 45. Maximum-likelihood COI tree of Merodon aureus subgroup. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.* 104
- Слика 46. *Maximum-likelihood* COI+28S стабло за *Merodon aureus* подгрупу. *Bootstrap* вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / *Figure 46. Maximum-likelihood COI+28S tree of Merodon aureus subgroup. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.* 106
- Слика 47. *Median-joining* мрежа 28S генотипова *Merodon aureus* групе. / *Figure 47. Median-joining network of 28S genotypes of Merodon aureus group.* 107
- Слика 48. Мапа дистрибуције *Merodon aureus* групе кроз области узорковања. Величина питичастих графика одговара броју различитих хаплотипова, црне линије повезују графике са локалитетима, док боја указује на припадност подгрупи, комплексу или врсти. / *Figure 48. The distribution map of Merodon aureus group through the sampling areas. The size of pie graphs corresponds to number of different haplotypes, black lines connect the pie graphs with localities, while colour depicts subgroups, complexes or species.* 109
- Слика 49. *Maximum-likelihood* стабло 16S рРНК гена *Wolbachia* сојева присутних код врста *Merodon aureus* групе. / *Figure 49. Maximum-likelihood tree based on 16S sequences of Wolbachia strains present in Merodon aureus species group.* 113

- Слика 50. *Maximum-likelihood* стабло *Merodon aureus* групе добијено анализом COI секвенци 1-2 представника сваке врсте; са означеним wsp хаплотипом *Wolbachia*. / *Figure 50. Maximum-likelihood tree of Merodon aureus species group produced using COI sequences of 1-2 specimens for each species; with marked Wolbachia wsp haplotypes.* 114
- Слика 51. Успешност анализираних молекуларних маркера у раздвајању врста *Merodon aureus* групе по комплексима и/или подгрупама. / *Figure 51. Utility of analysed molecular markers in Merodon aureus group species delimitation per complexes and/or subgroups.* 120
- Прилог 2: Слика П1. *Neighbor-joining* COI стабло *Merodon aureus* подгрупе. *Bootstrap* вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / *Figure P1. Neighbor-joining COI tree of Merodon aureus subgroup. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.* 176
- Прилог 2: Слика П2. *Neighbor-joining* COI стабло *Merodon caerulescens* комплекса. *Bootstrap* вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / *Figure P2. Neighbor-joining COI tree of Merodon caerulescens complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.* 177
- Прилог 2: Слика П3. *Neighbor-joining* COI стабло *Merodon cinereus* комплекса. *Bootstrap* вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / *Figure P3. Neighbor-joining COI tree of Merodon cinereus complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.* 178
- Прилог 2: Слика П4. *Neighbor-joining* COI стабло *Merodon atratus* комплекса. *Bootstrap* вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / *Figure P4. Neighbor-joining COI tree of Merodon atratus complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.* 179
- Прилог 2: Слика П5. *Neighbor-joining* COI стабло *Merodon luteomaculatus* комплекса. *Bootstrap* вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / *Figure P5. Neighbor-joining COI tree of Merodon luteomaculatus complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.* 180
- Прилог 2: Слика П6. *Neighbor-joining* COI стабло за *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* и *M. ambiguus* комплексе. *Bootstrap* вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / *Figure P6. Neighbor-joining COI tree of Merodon bessarabicus, M. sapphous and M. ambiguus complexes. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.* 181
- Прилог 2: Слика П7. *Neighbor-joining* COI стабло *Merodon chalybeus* комплекса. *Bootstrap* вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / *Figure P7. Neighbor-joining COI tree of Merodon chalybeus complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.* 182
- Прилог 2: Слика П8. *Neighbor-joining* COI стабло *Merodon dobrogensis* подгрупе. *Bootstrap* вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / *Figure P8. Neighbor-joining COI tree of Merodon dobrogensis subgroup. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.* 183
- Прилог 3: Слика П1. Мапа дистрибуције узорака *Merodon aureus* подгрупе. / *Figure P1. Distribution map of Merodon aureus subgroup samples.* 184

Прилог 3: Слика П2. Мапа дистрибуције узорака <i>Merodon cinereus</i> подгрупе. / <i>Figure P2. Distribution map of Merodon cinereus subgroup samples.</i>	184
Прилог 3: Слика П3. Мапа дистрибуције узорака <i>Merodon luteomaculatus</i> комплекс. / <i>Figure P3. Distribution map of Merodon luteomaculatus complex samples.</i>	185
Прилог 3: Слика П4. Мапа дистрибуције узорака <i>Merodon bessarabicus</i> комплекса, <i>M. sapphous</i> комплекса и <i>M. ambiguus</i> комплекса. / <i>Figure P4. Distribution map of Merodon bessarabicus complex, M. sapphous complex u M. ambiguus complex samples.</i>	185
Прилог 3: Слика П5. Мапа дистрибуције узорака <i>Merodon chalybeus</i> комплекса. / <i>Figure P5. Distribution map of Merodon chalybeus complex samples.</i>	186
Прилог 3: Слика П6. Мапа дистрибуције узорака <i>Merodon dobrogensis</i> подгрупе. / <i>Figure P6. Distribution map of Merodon dobrogensis subgroup samples.</i>	186



1. Увод

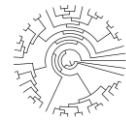
Савремени свет је суочен са глобалном кризом биодиверзитета. Већи број врста је угрожен или на прагу изумирања као последица разарања и поремећаја природних екосистема. Узимајући у обзир да многе врсте још увек нису описане, напори да се детектује и објасни постојећи диверзитет су од посебног значаја (Bickford и сар., 2007).

Током првих неколико година XXI века са циљем да се открије и опише постојећи диверзитет у таксономију се уводи анализа варијабилности ДНК секвенци одабраних генских маркера и наглашава значај интеграције знања из различитих дисциплина (сумирано у Goulding и Dayrat, 2016). Комбиновање података са циљем да се открију нове врсте постаје основа новог приступа у таксономији. Интегративна таксономија подразумева интеграцију информација добијених применом морфолошких проучавања, генетике, геометријске морфометрије, анализе дистрибуције, еколошких захтева и сл. (Dayrat, 2005; Pires и Marinoni, 2010). Овај приступ омогућио је брз напредак на пољу открића нових врста и решавању таксономије комплексних група са блиско сродним и криптичним врстама.

Присуство криптичних врста постало је очигледан управо захваљујући примени молекуларних маркера. Додатно, примена молекуларних маркера омогућила је препознавање популација које су у погледу генетичке композиције веома различите од популација исте врсте. Овакве популације су кандидати за дефинисање еволуционо значајних јединица које је потребно заштити и сачувати, чак и када оне нису дефинисане као засебне врсте (Frankham и сар., 2004).

У молекуларној таксономији животињских врста најчешће се користи кратка секвенца на 5' крају митохондријалног гена за цитохром ц оксидазу I (COI). Овај регион, познат под називом ДНК баркод, чини основу глобалног систем биолошке идентификације и класификације код животиња (Hebert и сар., 2003a, b).

Примена молекуларних податка нарочито је корисна у таксономији група које се одликују великом разноврсношћу, као што су инсекти. Додатно утврђивање диверзитета инсеката је посебно битно са аспекта разликовања за човека корисних и штетних врста. Једна од посебно значајних група међу инсектима су полинатори. Узимајући у обзир сложеност везе између полинатора и биљака које опрашују, јасно је да разноврсност и бројност полинатора може имати директан утицај на продукцију семена и плодова биљака. Поред пчела, веома важне полинаторе представљају и



представници фамилије осоликих мува. Тако на пример, осолике муве из рода *Merodon* Meigen су важне као полинатори великог броја дивљих и култивисаних биљних врста (Hurkmans, 1993; Marcos-García и сар., 2007; Ståhls и сар., 2009).

Осолике муве, сирфиде (Diptera: Syrphidae) обухватају око 6000 описаних врста и генерално су широко распрострањене у свету (Rotheray и Gilbert, 2011). Врсте насељавају веома разнолика станишта од нивоа мора до 3500 метара надморске висине (Vujić и сар., 2002; Barkalov и Ståhls, у припреми). Поред морфолошки јасно дефинисаних и лако препознатљивих врста, фамилија Syrphidae обухвата и врсте које су морфолошки веома сличне или готово идентичне. До сада највећи број криптичних врста сирфида забележен је у подфамилији Eristalinae (Marcos-García и сар., 2011; Vujić и сар., 2013; Popović и сар., 2015; Ačanski и сар., 2016; Šašić и сар., 2016; Radenković и сар., 2018), али се јављају и у подфамилији Syrphinae (Nedeljković и сар., 2013; 2015) и Microdontinae (Schönrogge и сар., 2002). Значајан напредак у таксономији сирфида остварен је управо захваљујући примени молекуларних маркера. Најчешће су у употреби секвенце 3' и 5' региона митохондријалног COI гена које многи истраживачи комбинују са подацима о анализи секвенци једарних молекуларних маркера као што су нуклеарни гени за рибозомалну РНК (рРНК) (нпр. Pérez-Bañón и сар., 2003; Massetti, 2006; Mengual и сар., 2008a, b; Naarto и Ståhls, 2014; Mengual и сар., 2015).

Међу сирфидама род *Merodon* Meigen, 1903 је посебно интересантан с обзиром на велики број врста и њихову функцију у опрашивању. У оквиру овог рода вликом разноврсношћу врста издваја се *Merodon aureus* Fabricius, 1805 група. Целокупан диверзитет ове групе још увек је непознат, али новија истраживања указују да поред фенотипски различитих ову групу одликује и присуство већег броја криптичних таксона (Milankov и сар., 2008a; Šašić и сар., 2016; Radenković и сар., 2018).

Током претходних истраживања *Merodon aureus* групе Milankov и сар. (2008a) и Francuski и сар. (2011) указали су на присуство најпре шест криптичних врста: *M. aureus* A, B, C, и *M. cinereus* A, B, C. *M. cinereus* B је потом дефинисана као комплекс три врсте (*M. atratus* (Oldenberg, 1919), *M. virgatus* Vujić et Radenković, 2016 и *M. balkanicus* Šašić, Ačanski et Vujić, 2016) назван *M. atratus* комплекс (Šašić и сар., 2016). Поменути налази нагласили су потребу за дубљим, свеобухватним и интегративним истраживачким приступом који ће омогућити потпуно разјашњење таксономије групе. Утврђивање молекуларног диверзитета је корак ка постизању овог циља.



2. Преглед литературе

2.1. *Merodon aureus* група (Diptera, Syrphidae)

Осолике муве, сирфиде (Syrphidae), чине врстама богату и широко распрострањену фамилију инсеката из реда двокрилаца (Diptera). Адултне јединке имају способност лебдења или лебдења уз благе покрете у различитим правцима те се често у народу среће и назив муве лебдилице. Сирфиде су широко распрострањене по целом свету, присутне су готово свуда на земљи осим на Антартику и удаљеним океанским острвима. Већина родова ограничена је на један биогеографски регион (Холарктик, Неотропски или Палеотропски) регион. Већина врста је диурнална и веома активна, а постоје и примери врста које су миграторне (Thompson и Rotheray, 1998). Назив осолике муве указује на њихово адаптивно својство да распоредом трака и боја на тораксу и абдомену опонашају пчеле, осе или бумбаре. Мимикрија фенотипа пчела, оса или бумбара има адаптивни значај јер представља вид заштите од потенцијалних предатора (Thompson и сар., 1976; Azmeh и сар., 1998; Thompson и Rotheray, 1998; Holloway и сар., 2002; Edmunds, 2008). Овај вид мимикрије се назива Бејтсова мимикрија (Bates, 1862). Бејтсова мимикрија се односи на опонашање апосематске (упозоравајуће) обојености инсеката који су отровни или непријатног укуса за предаторе због хемијских материја које продукују. Функција Бејтсове мимикрије је да завара потенцијалне предаторе, тако да верују да су сви инсекти са апосематском обојеношћу отровни или непријатног укуса (Holloway и сар., 2002).

Фамилија Syrphidae Latreille, 1802 обухвата четири подфамилије: Microdontinae, Syrphinae, Eristalinae (Thompson и Rotheray, 1998) и Pipizinae (Mengual и сар., 2015). Род *Merodon* припада подфамилији Eristalinae и обухвата више од 160 фитофагних врста осоликих мува распрострањених широм Палеарктичког и Палеотропског региона (Ståhls и сар., 2009; Vujić и сар., 2012). Са више од 120 описаних врста најзаступљенији је род осоликих мува у Европи (Radenković и сар., 2018). Врсте овог рода су присутне у региону Медитерана, као и биљке са подземним органима које су домаћини њихових ларви током раног развића (Hurkmans, 1993). Адултне јединке сирфида из рода *Merodon* су важне као полинатори великог броја дивљих и култивисаних монокотиледоних геофита (Hurkmans, 1993; Marcos-García и сар., 2007; Ståhls и сар., 2009). Ларвално развиће се одвија у подземним органима ових биљака, а адулти се често хране поленом и нектаром њихових цветова (Hurkmans, 1993; Ricarte и сар., 2008;



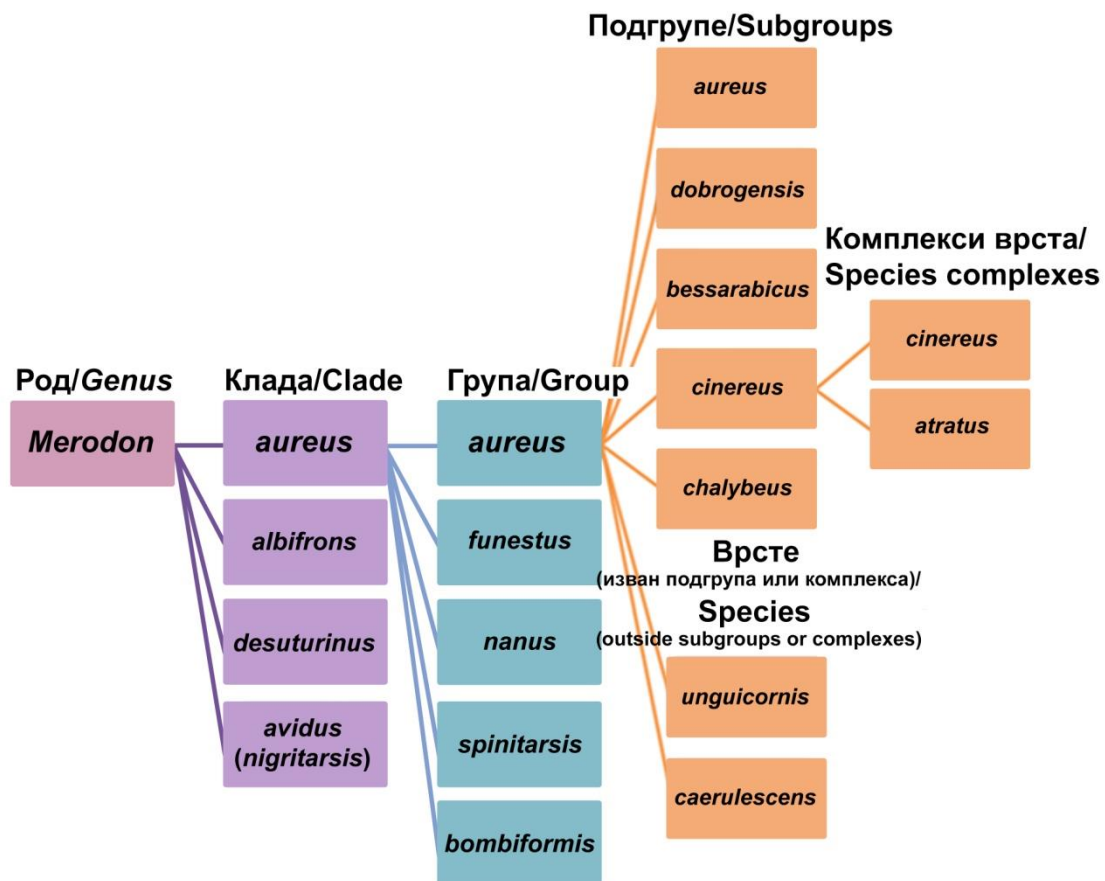
Andrić и сар., 2014; Vujić и сар., 2015). Биљке су се вероватно прилагодиле овим опрашивачима развијајући велике подземне органе за складиштење који су толерантни на исхрану ларви (Ricarte и сар., 2008), а заузврат, адултне јединке рода *Merodon* опрашују њихове цветове. У потрази за поленом и нектаром врсте овог рода посећују и друге цветнице. Често се срећу на цветовима биљака из фамилија Ариасеае, Астерасеае, Еупорбиасеае и другим (Marcos-García и сар., 2007).

Merodon aureus група обухвата врсте морфолошки сличне са *M. aureus* Fabricius, 1805. Врсте су ситне (8 - 13 mm) са кратким заобљеним абдоменом, истакнутим шиљком на метатрохантеру код мужјака и карактеристичном структуром гениталија мужјака (Vujić и сар., 2007; Radenković и сар., 2011). Група обухвата укупно 30 познатих и новоописаних врста у региону Медитерана и планинским областима јужне Европе (Marcos-García и сар., 2007; Vujić и сар., 2007; Milankov и сар., 2008a; Radenković и сар., 2011; Speight, 2014; Šašić и сар., 2016; Veselić и сар., 2017; Radenković, 2018): *M. cinereus* (Fabricius, 1794), *M. aureus* Fabricius, 1805, *M. chalybeus* Wiedemann, 1822, *M. flavicornis* Macquart, 1842, *M. pumilus* Macquart, 1849, *M. caerulescens* Loew, 1869, *M. minutus* Strobl, 1893, *M. unguicornis* Strobl, 1909, *M. unicolor* Strobl, 1909, *M. rufipes* Sack, 1913, *M. atratus* (Oldenberg, 1919), *M. bessarabicus* Paramonov, 1924, *M. dobrogensis* Bradescu, 1982, *M. ambiguus* Bradescu, 1986, *M. hayati* Hurkmans, 1997, *M. legionensis* Marcos-García, Vujić et Mengual, 2007, *M. quercetorum* Marcos-García, Vujić et Mengual, 2007, *M. sapphous* Vujić, Pérez-Bañon et Radenković, 2007, *M. puniceus* Vujić, Radenković et Pérez-Bañón, 2011, *M. virgatus* Vujić et Radenković, 2016, *M. balkanicus* Šašić, Ačanski et Vujić, 2016, *M. nisi* Veselić, Vujić et Radenković 2017, *M. robustus* Veselić, Vujić et Radenković 2017, *M. adriaticus* Veselić, Vujić et Radenković 2017, *M. luteomaculatus* Vujić, Ačanski et Šašić, 2018, *M. euri* Vujić et Radenković, 2018, *M. peloponnesius* Vujić, Radenković, Ačanski et Šašić, 2018, *M. erymanthius* Vujić, Ačanski et Šašić, 2018, *M. andriotes* Vujić, Radenković et Šašić, 2018 и *M. naxius* Vujić et Šašić, 2018.

На основу анализе суптилних варијација морфолошких карактера Šašić и сар. (2016) су предложили увођење четири нивоа хијерархијске класификације рода *Merodon* према нивоима морфолошке диференцијације (Сл.1) са посебним освртом на *M. aureus* групу. Први, најшири ниво се односи на велике монофилетске **клате** које обухватају већи број морфолошки разноликих група врста. Дефинисане су четири клате: *M. aureus*, *M. albifrons*, *M. desuturinus* и *M. avidus* (*M. nigratarsis*) (sensu Mengual и



сар., 2006). Наредни, нижи ниво укључује таксоне који чине морфолошки дефинисане **групе врста**. У оквиру *M. aureus* кладе то су: *M. aureus*, *M. funestus*, *M. nanus*, *M. spinitarsis* и *M. bombiformis* група (sensu Radenković и сар., 2011). Трећи ниво чине **подгрупе** које укључују врсте веома сличне морфологије, али са јасним разликама у морфолошким карактерима између врста различитих подгрупа. Најнижи, четврти ниво ове класификације представљају **комплекси врста** које чине таксони које је немогуће разликовати на основу варијација морфолошких карактера који се користе у класичном таксономском приступу. Врсте унутар комплекса врста је могуће разликовати применом метода интегративне таксономије које укључују анализу молекуларних маркера, морфометрију и екологију.



Слика 1. Положај *Merodon aureus* групе унутар класификационе шеме предложене у Šašić и сар. (2016). / Figure 1. The placement of *Merodon aureus* group within the classification sheme proposed by Šašić et al. (2016).

Merodon aureus група врста обухвата пет подгрупа: *M. aureus*, *M. dobrogensis*, *M. bessarabicus*, *M. chalybeus* и *M. cinereus* подгрупу. *M. aureus* подгрупа укључује врсте са тамним тибијама и светлим длакама на мезонотуму: *M. aureus*, *M. pumilus*, *M. unicolor*.



M. dobrogensis подгрупа обухвата врсте са жутим тибијама, кратким длакама на телу и црвеним тергитима: *M. dobrogensis* и *M. puniceus*. *M. bessarabicus* подгрупа укључује врсте са претежно жутим тибијама и тамним тергитима попут *M. ambiguus*, *M. bessarabicus*, *M. legionensis*, *M. hayati*, *M. quercetorum* и *M. sapphous*. *M. chalybeus* подгрупа обухвата врсте са тамним тибијама: *M. chalybeus* и *M. minutus*. *M. cinereus* подгрупа обухвата таксоне са претежно тамним тибијама, горњом половином тибија или задњим делом покривеним тамним длакама и траком црних длака у основи крила. У *M. cinereus* подгрупи утврђено је присуство два комплекса врста *M. cinereus* и *M. atratus* комплекса док комплекси у осталим подгрупама *M. aureus* групе морају бити дефинисани применом интегративног таксономског приступа (Šašić и сар., 2016).

2.2. Интегративни приступ у таксономији

Интезиван прогрес на пољу открића нових врста омогућен је захваљујући интегративном приступу у таксономији који подразумева интеграцију информација добијених применом морфолошких проучавања, генетике, геометријске морфометрије, анализе дистрибуције, еколошких захтева и сл. Циљ интегративне таксономије је раздвајање јединица биолошког диверзитета применом већег броја комплементарних података различитих области истраживања (филогеографија, компаративна морфологија, популациона генетика, екологија, развојна биологија, биологија понашања итд.) (Dayrat, 2005; Pires и Marinoni, 2010). Фундаментална идеја на којој почива интегративна таксономија јесте да се олакша раздвајање, као и опис врста нових за науку применом што већег могућег броја доступних метода (Goulding и Dayrat, 2016).

Интегративна таксономија настаје из потребе да се превазиђу несавршености морфолошки базираног приступа, да се објасне случајеви где само анализа морфологије није довољна, да се олакша процес проналаска и описа нових врста, као и да се разумеју процеси који доводе до настанка врста (Schlick-Stainer, 2010). Према Yeates и сар. (2011) интегративни приступ у таксономији би требао бити примењив на широк спектар таксона и типова карактера. Требао би да буде примењив на биљкама и животињама, на групе које се размножавају сексуално и асексуално. Приступ би требао да буде заснован на примени основних типова података за рутинску примену приликом одређивања граница врста (морфолошки и молекуларни подаци). Такође би



требало да постоји могућност додавања нових типова података који се могу третирали као категоричка стања карактера у матрици (понашање, екологија, дистрибуција, итд.). Интегративна таксономија треба да обухвата квалитативне, полиморфне, меристичке и континуалне особине. У идеалним случајевима је пожељно да се на основу доступних података одреди и статистичка вероватноћа дефинисаних граница врста. Дефинисане границе врста се третирају као хипотезе са одређеном статистичком вероватноћом и као такве могу бити тестиране поново са новим типовима податка, другачијим од оних на којима је утемељена хипотеза.

Према Yeates и сар. (2011) оно што је првобитно названо интегративна таксономија је заправо итеративна таксономија којом се откривају и дефинишу границе врста применом мултиплих линија доказа. У случају када различити маркери или групе маркера показују неслагање око граница врста, може се вршити итеративно тестирање хипотезе о границама врста док се не појаве докази који дају еволуциону интерпретацију неслагања између података. Основа итеративне таксономије је континуирано тестирање и поновно тестирање хипотеза о границама врста са новим изворима података. Овај приступ има превасходно квалитативни карактер док се квантитативна анализа најчешће изоставља. Са побољшањем аналитичких метода уводи се квантитативни карактер интегративне таксономије.

Постоје два основна начина интеграције података различитих научних дисциплина у циљу утврђивања таксономске припадности врсти (Padijal и сар., 2010). Интеграција додавањем почива на претпоставци да дивергенција у било којој особини организма која представља таксономски карактер може бити доказ раздвајања врста. У пракси, докази из различитих доступних сетова карактера се посматрају кумулативно, при чему се поклапање или одступање у дивергенцији ових сетова објашњавају са еволуционог становишта и одлука се доноси на основу доступних доказа тако да нова врста може бити описана само на основу једног сета карактера уколико се тај сет сматра добрим индикатором раздвајања линија. Други начин интеграције је интеграција подударањем где подударност у дивергенцији више различитих типова карактера који имају таксономски значај указује на раздвајање линија. 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, оба начина интеграције имају одређена ограничења. Интеграција додавањем може довести до лажно позитивних резултата у раздвајању



врста услед некритичке примене само једног типа доказа (нпр. један локус митохондријалне ДНК (мтДНК)). С друге стране, интеграција подударањем је приступ који може довести до потцењивања стварног броја врста услед немогућности да се детектују криптичне или младе врсте (Padijal и сар., 2010).

Padijal и сар. (2010) истичу да приступ у интегративној таксономији мора да буде такав да користи предности оба основана начина интеграције података при чему се разматра начин на који карактери указују на раздвајање линија, као и функционални значај карактера у процесу специјације. Када се један таксономски проблем анализира применом различитих научних дисциплина (типова податка), најјаснији резултат је слагање резултата између дисциплина. Подударност у резултатима различитих дисциплина се сматра јачим доказом открића еволуционог образаца него када се користе резултати само једне дисциплине. Ипак треба узети у обзир да упркос слагању између дисциплина закључак о броју врста у природи може бити погрешан. Овај ризик се не може избећи, али се смањује са повећањем броја примењених типова података (дисциплина). У случају неподударања резултата, потребно је пронаћи објашњење за настало неслагање у светлу еволуције (Schlick-Stainer, 2010).

Процес раздвајања врста се може вршити на два начина. Први начин се односи на анализу узорак без претходне хипотезе о броју присутних врста, тако да хипотезе произилазе из података о узорцима. Други начин подразумева тестирање претходне хипотезе о постојању врста, у том случају почетна хипотеза може бити дефинисана на основу једног типа података и бити тестирана применом другог. Да би се хипотеза сматрала оправданом потребно је да буде подржана са више од 95% узорак (Schlick-Stainer, 2010).

Настанак интегративне таксономије уско је везан за појаву ДНК баркодинга и анализу молекуларних маркера у циљу раздвајања врста и представљао је покушај да се класичан таксономски приступ унапреди применом анализе ДНК секвенци (Goulding и Dayrat, 2016). Анализа молекуларних маркера дала је нову димензију таксономском приступу и омогућила откривање морфолошки скривеног диверзитета врста.

2.3. Молекуларни маркери у таксономији

Избор одговарајућег молекуларног маркера од пресудне је важности у таксономији. Приликом избора треба имати на уму да је стопа еволуције различита за различите групе организама те да маркер који је применљив код једне групе не мора

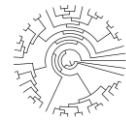


бити адекватан и за неку другу. Тако се код животиња најчешће анализира секвенца митохондријалног COI гена, док тај ген за биљке и гљиве није адекватан (Pires и Marinoni, 2010). У систематици избор додатно зависи и од таксономске категорије која се одређује, али и од разлике у варијабилности између појединачних маркера. Молекуларни маркери са вишом еволутивном стопом показују и високу варијабилност те су погодни за анализу филогенетских односа на нижим таксономским нивоима, док се споро еволуирајући молекуларни маркери примењују у реконструкцији дубљих филогенетских грана (Hwang и Kim, 1999).

2.3.1. Митохондријални маркери и ДНК баркодинг

Традиционални приступ у таксономији базиран на опису стања морфолошких карактера има ограничену примену у идентификацији врста, посебно у случају фенотипске пластичности, присуства морфолошки криптичних таксона и у случају када постоје морфолошке разлике између развојних стадијума и/или између полова. (Hebert и сар., 2003а). Увођење молекуларних података у таксономију се показало корисним за разјашњење статуса врста у многим оваквим случајевима.

Генерално се сматрало да мтДНК поседује специфичне биолошке карактеристике које је чине адекватним маркером молекуларног биодиверзитета. Сматрало се да се мтДНК искључиво клонално наслеђује, по материнској линији, да еволуира готово неутрално и да је стопа еволуције мтДНК приближно константна и слична часовнику (енг. *clock-like*). Galltier и сар. (2009) су сумирали резултате вишегодишњих истраживања на тему адекватности примене митохондријалних маркера и том приликом показано је да су рекомбинације мтДНК ипак могуће и да могу утицати на интерпретацију мтДНК генеалогije унутар врста. Као што је познато мтДНК није функционално неутрална, с обзиром да поседује функционално важне гене, али се сматрало да су не-неутралне или адаптивне мутације веома ретке у митохондријалном геному. Показано је међутим, да је позитивна селекција могућа и то у форми селекције ка адаптивно супериорнијим варијантама у смислу продукције метаболичке енергије. "Себичне" мтДНК мутације могу да фаворизују пренос мтДНК на наредну генерацију независно од тога на који начин се мења адаптивна способност организма. У условима када су мтДНК варијанте саме по себи неутралне, оне могу бити фаворизоване у наредној генерацији услед тога што су везане за друге генетичке елементе који се преносе матернално и на које може да делује позитивна селекција (енг. *hitch-hiking*). Унутарћелијски симбионтски микроорганизми (нпр. *Wolbachia*) који се



наслеђују по материнској линији могу условити ширење одређених мтДНК хаплотипова у популацији. Поред тога, показано је да стопа еволуције мтДНК може да се разликује чак и између две генетичке линије исте врсте (Galltier и сар., 2009). Према томе, мтДНК нису идеални маркери молекуларног диверзитета како се раније мислило. Међутим, употреба мтДНК секвенци у ДНК баркодингу ипак указује на одређене предности истих (Galltier и сар., 2009).

У ДНК баркодингу, сличност у краткој секвенци ДНК се користи као показатељ припадности јединки одређеној врсти, док висока варијабилност између ДНК баркод секвенци јединки претходно описаних врста може указати на потенцијално присуство криптичних врста. Раздвајање јединки у групе на основу одређене граничне вредности генетичке дивергенције може указати на припадност посебним врстама (видети: Bickford и сар., 2007; Puillandre и сар., 2012; Hubert и Hanner, 2015). Узимајући у обзир ретке инсерције/делеције у митохондријалним генима, доступност универзалних прајмера за амплификацију и високу стопу нуклеотидних супституција, као ДНК баркод секвенца код животиња одабрана је секвенца дужине 648 bp на 5' крају митохондријалног гена за цитохром ц оксидазу I (COI) (Hebert и сар., 2003a, b).

ДНК баркодинг примену налази у таксономији јер може бити користан за идентификацију врста, односно утврђивање припадности јединки одређеној врсти. Поред тога, груписање јединки на основу дивергенције ДНК секвенци може бити основа за даљу анализу, применом додатних типова података, који заједно могу бити примењени за утврђивање граница између врста. Подела или раздвајање врста на основу дивергенције ДНК секвенци могућа је када постоји разлика у дивергенцији секвенци унутар и између врста, међутим та разлика се не јавља увек и код свих таксона (Pires и Marinoni, 2010; Puillandre и сар., 2012). Према томе, у неким случајевима ДНК баркод неће бити погодан за примену у таксономији, односно у случајевима када не постоји јасна граница молекуларне дивергенције унутар и између врста (Puillandre и сар., 2012).

Еволутивни процеси који утичу на смањење мтДНК диверзитета између врста кроз хибридну интрогресију и/или еволутивни процеси који продукују балансну селекцију која одржава висок диверзитет унутар врста, могу резултовати смањењем разлике диверзитета унутар и између врста. Ово за последицу може довести до погрешних закључака у систематици базираној на примени ДНК баркод секвенци. Супротно томе, селективни притисак који резултује смањењем варијабилности мтДНК



унутар врста додатно повећава разлику диверзитета унутар и између врста чинећи ДНК баркодинг прецизнијим. Дакле, иако селекција на нивоу мтДНК може узроковати грешке у интерпретацији постојећег диверзитета и популационе историје врста, не мора утицати на прецизност примене ДНК баркода у таксономији (Galltier и сар., 2009).

Првобитна примена ДНК баркодинга у утврђивању граница врста била је базирана на примени стандардизоване вредности дивергенције секвенци неопходне за раздвајање (Hebert и сар., 2003b). Сумирањем резултата истраживања за неколико редова инсеката: Isoptera, Phthiraptera, Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera, Diptera и Hymenoptera, Cognato и сар. (2006) су касније указали на проблем примене стандардизоване граничне вредности дивергенције секвенци у одређивању граница врста код инсеката. На основу поређења дивергенције секвенци митохондријалних и једарних локуса, аутори су утврдили да постоји преклапање вредности дивергенције унутар и између врста у 45% случајева, када се користи стандардизована вредност дивергенције (2% (Hebert и сар., 2003b)). Према томе, аутори истичу да стандардна вредност дивергенције мора бити успостављена за сваки молекуларни маркер (ген) и таксон појединачно и да коначан закључак о раздвајању врста мора бити базиран на примени додатних биолошких доказа и евалуацији од стране искусних таксонома.

У групама које су слабо проучене, ДНК баркодинг омогућава брзу процену укупног биодиверзитета и разврставање узорка у генетички различите групе. ДНК баркодинг није замена за класичну таксономију, али представља значајан допринос таксономским истраживањима и истраживањима биодиверзитета генерално (Најиббаеи и сар., 2007).

Увођење ДНК баркодинга има широку примену и у таксономији сирфида, где се у анализи подједнако користе секвенце 5' и 3' крај COI гена (нпр. Pérez-Vaño и сар., 2003; Mengual и сар., 2006; Ståhls и сар., 2008; 2009; Marcos-García и сар., 2011; Vujić и сар., 2012; 2013; Grković и сар., 2015; Ačanski и сар., 2016; Šašić и сар., 2016; Chroni и сар., 2017; Radenković и сар., 2018; Nedeljković и сар., у штампи).

2.3.2. Митонуклеарна коадаптација и специјација

Као што је наглашено у претходним поглављима, ДНК баркодинг се показао значајаним у истраживању постојећег биолошког диверзитета, а посебно код животиња. Висока успешност ДНК баркода у утврђивању граница врста доводи се у



везу са природом COI гена. Наиме, овај митохондријални ген кодира субјединцу I цитохром c оксидазе која представља битан део електрон транспортног ланца унутрашње митохондријалне мембране, а чија улога је да ћелији обезбеди енергију. Поред митохондријалних гена, протеински производи неких нуклеарних гена такође улазе у састав електрон транспортног ланца. Према томе митохондријални и нуклеарни гени морају да функционишу у координацији како би омогућили формирање комплекса електрон транспортног ланца и обезбедили ћелијско дисање (Rand и сар., 2004; Lane и сар., 2009).

Према Hill (2015) коадаптација производа поменутих гена је есенцијална за функционисање организма. Да би се ова митонуклеарна коадаптација одржала, нуклеарни гени који кодирају митохондријане протеине морају да коеволуирају са митохондријалним генима. У изолованим популацијама митонуклеарна коеволуција може довести до специјације услед стварања популационо специфичних митонуклеарних коадаптација које доводе до митонуклеарне инкомпатибилности популација и формирања баријере протоку гена. Поред тога, као одговор на климатске и висинске промене долази до адаптивне дивергенције производа митохондријалних гена и брзе фиксације митохондријалних хаплотипова који се разликују између популација чиме се додатно успорава или прекида протока гена (Lane и сар., 2009; Mishmar и сар., 2006; Hill, 2015). Прекид протока гена између популација представља први корак ка специјацији.

Према томе адекватност примене COI гена као митохондријалног маркера у таксономији није последица случајности већ његове есенцијалне улоге у организму (Lane и сар., 2009; Hill, 2015).

2.3.3. Нуклеарни рРНК гени

Упркос значајном доприносу таксономији приступ заснован на примени појединачног гена за утврђивање граница врста има одређена ограничења, посебно уколико се ради о митохондријалном гену (видети Galtier и сар., 2009; Hubert и Hanner, 2015). Према томе, у таксономији, ситематици и филогенији сирфида молекуларна анализа секвенци COI гена се често комбинује са анализом секвенци нуклеарних молекуларних маркера као што су рРНК гени (18S и 28S) (нпр. Skevington и Yeates, 2000; Ståhls и Nyblom, 2000; Pérez-Bañón и сар., 2003; Ståhls и сар., 2003; Massetti и сар., 2006; Mengual и сар., 2008a, b; Reemer и Ståhls, 2013; Mengual и сар., 2015).



рРНК гени су у нуклеарном геному присутни у већем броју копија и по правилу се преписују заједно. Свака репетитивна јединица рДНК садржи гене који кодирају 18S рРНК, 28S рРНК и 5,8S рРНК. Гени су раздвојени некодирајућим регионима, односно спејсерима. 28S рРНК ген једног поновка одвојен је од гена 18S рРНК другог поновка са интергенским спејсером (IGS) кога чине два спољашња транскрибујућа спејсера (ETS) и један нетранскрибујући (NTS). Између 18S рРНК гена и 5,8S рРНК гена је унутрашњи транскрибујући спејсер 1 (ITS1), а између 28S рРНК гена и 5,8S рРНК гена је унутрашњи транскрибујући спејсер 2 (ITS2). Стопа еволуције је бржа у спејсер регионима него у кодирајућим регионима, а као последица мањег утицаја мутација у спејсер регионима на преживљавање организама. Захваљујући присуству региона различите варијабилности могућа је примена ових маркера за осветљавање филогенетских веза на различитим таксономским нивоима. Тако се 18S рРНК ген због своје конзервативности користи у реконструкцији дубљих филогенетских грана, као што су царства, раздели, класе или редови. 5,8S рРНК ген има сличан мали степен нуклеотидне варијабилности, али је секвенца овог гена сувише кратка за филогенетску анализу. Секвенца гена за 28S рРНК се често користи на нивоу редова или фамилија. 18S рРНК и 28S рРНК гени садрже домene од којих су неки високо варијабилни, а други високо конзервативни. Секвенце високо варијабилних региона се користе на нижим таксономским категоријама, фамилијама или понекад родовима. Анализа секундарне структуре 18S и 28S рРНК се користи у филогенији таксономских категорија изнад нивоа реда, а као последица високе конзервативности исте. Спејсер региони се одликују високом варијабилношћу те су значајни за анализу на нивоу родова, врста и популација (Hwang i Kim, 1999).

рРНК гени еволуирају спорије од гена који кодирају протеине, те могу бити значајни за анализу врста које нису блиско сродне (Patwardhan и сар., 2014). За блиско сродне врсте анализа секвенци рРНК гена није најбољи први избор у молекуларној таксономији с обзиром на недовољну варијабилност ових молекуларних маркера. 28S рРНК и 18S рРНК гени се ретко примењују у молекуларној таксономији сирфида, а уколико се и користе најчешће је то уз анализу секвенци COI гена (Radenković и сар., 2018; Kočiš Tubić и сар., у припреми). Слично је и у другим инсекатски групама (нпр. Raupach и сар., 2010; Thormann и сар., 2011). С друге стране рРНК гени се често примењују у филогенетским анализама осоликих мува на нивоу рода (нпр. Ståhls и Nyblom, 2000; Massetti и сар., 2006; Mengual и сар., 2008b; Reemer и Ståhls, 2013). У



оквиру рода *Merodon*, Mengual и сар. (2006) су проучавали филогенетске везе између Иберијских врста сирфида овог рода користећи се анализом секвенци COI гена, ITS2 и 28S рРНК гена. Комбинована анализа COI и 28S потврдила је сличне филогенетске односе унутар рода *Merodon* из Европе и Турске (Vujić и сар., 2012).

У молекуларној таксономији осоликних мува анализа сквенци ITS2 региона се показала значајна у раздвајању врста из подфамилије Syrphinae. Анализа ITS2 региона допринела је успостављању статуса *Chrysotoxum festivum* (Linnaeus, 1758) групе (Nedeljković и сар., 2013), као и нових врста у родовима *Melanostoma* Schiner, 1860 (Haarto и Ståhls 2014) и *Xanthogramma* Schiner, 1861 (Nedeljković и сар., у штампи).

2.4. Таксономија криптичних врста

Према Bickford и сар. (2007) две или више врста сматрамо криптичним уколико јесу или су биле класификоване као једна врста под истим именом, а као последица високе морфолошке сличности. Повећане вредности генетичке дивергенције унутар морфолошки дефинисане врсте у односу на просечно очекиване у комбинацији са суптилним морфолошким, географским и другим разликама могу бити индикатор присуства криптичних врста (видети нпр. Bond и сар., 2001; Lee и Frost, 2002; Yeh и сар., 2004; Herrera и сар., 2010). Учесталост којом се описују криптичне врсте на основу анализе ДНК секвенци (уз потврду на основу морфолошких и/или еколошких података) указује на важност примене молекуларних метода у таксономским истраживањима (Bickford и сар., 2007). У току протеклих неколико година традиционална таксономија је често комбинована са молекуларним анализама секвенци митохондријалног COI гена.

Употреба молекуларних података у изучавању таксономије *Merodon aureus* групе врста указала је на могућност постојања додатних криптичних таксона унутар групе (Mengual и сар., 2006; Milankov и сар., 2008a). Mengual и сар. (2006) су показали да две морфолошки веома сличне јединке *M. unicolor* показују COI дивергенцију од 1.25% што је указало на могућност постојања криптичних врста. Додатно, шест криптичних таксона је идентификовано унутар морфолошки описаних врста *M. aureus* и *M. cinereus* (Fabricius, 1794) на Балканском полуострву (Milankov и сар., 2008a), док су још две врсте пронађене у *M. atratus* комплексу (Šašić и сар., 2016) и шест у *M. luteomaculatus* комплексу (Radenković и сар., 2018).



Криптичне врсте идентификоване од стране Milankov и сар. (2008a) чине два комплекса врста: *Merodon aureus* комплекс врста и *M. cinereus* комплекс врста. Таксони у оквиру *M. aureus* комплекса означени су као: *M. aureus* А, В и С, а унутар *M. cinereus* комплекса врста као: *M. cinereus* А, В и С. На основу морфолошких карактера проучаваних популација *M. aureus* групе било је могуће разликовати четири морфотипа: *M. aureus* А+В, *M. aureus* С, *M. cinereus* А+С, *M. cinereus* В. *M. aureus* А и *M. aureus* В као и *M. cinereus* А и *M. cinereus* С су раздвојени анализом алозима и на основу дивергенције 3'COI секвенци. Међутим, анализа 3'COI није указала на разлику између *M. aureus* С, *M. cinereus* В и *M. cinereus* С. Анализа алозима (Milankov и сар., 2008a) и геометријска морфометрија величине и облика крила (Francuski и сар., 2011) потврдиле су присуство шест криптичних таксона у оквиру *M. aureus* групе врста (три унутар *M. aureus* комплекса и три унутар *M. cinereus* комплекса).

Šašić и сар. (2016) су утврдили да *Merodon cinereus* В према Milankov и сар., (2008a) заправо чини комплекс три блиско сродне, криптичне врсте сирфида. Дефинисани комплекс је добио назив *M. atratus* комплекс према номиналној врсти *M. atratus*. На основу суптилних разлика у распореду црних длака на тергитима 3 и 4 могуће је разликовати врсту *M. atratus* од друге две врсте овог комплекса, *M. virgatus* и *M. balkanicus*. Поменуте две врсте нису показале конзистентну варијацију морфолошких карактера која би могла указати да је реч о посебним таксонима. Упркос морфолошкој сличности *M. virgatus* и *M. balkanicus*, све три врсте из комплекса показују генетичку дивергенцију (анализа мтДНК COI секвенци) која је у сагласности и са резултатима геометријске морфометрије крила и стила. Додатно, анализа еколошких ниша показала је раздвајање поменутих алопатричних врста на основу еколошких захтева.

Применом интегративне таксономије у *Merodon luteomaculatus* комплексу су препознате врсте: *M. andriotes*, *M. euri*, *M. erymanthius*, *M. luteomaculatus*, *M. naxius*, и *M. peloponnesius*. Специјација у овом комплексу је вероватно последица палеогеографске историје регије у којој су врсте дистрибуиране (Балканско полуострво и Егејска острва, Наксос и Андрос). Врсте су раздвојене на основу интеграције резултата анализе молекуларних маркера (COI и 28S рРНК секвенци, ISSR профила), геометријске морфометрије крила и стила, као географске дистрибуције (Radenković и сар., 2018).



2.5. Одлике биодиверзитета Медитеранске регије

Медитерански регион је једна од геолошки најкомплекснијих области света, као и јединствен случај у свету где је велика морска површина окружена са три различита континента. Захваљујући високом степену биолошког диверзитета, Медитерански басен је препознат као једна од области са највећим биодиверзитетом у свет (енг. *hotspots*). Због комплексности климе, историје, геологије и топографије регије, на хиљаде географски изолованих популација настају острва, полуострва и планинске венце, где је локалном диференцијацијом настао велики број ендемских врста и подврста. Висок ниво ендемизма присутан код већег броја биљних и животињских група одговоран је за постојање такозваног скривеног диверзитета који представља разлог непрекидног повећања броја описаних врста Медитеранске регије (Blondel и сар., 2010).

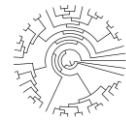
Полуострва Медитеранске регије су извор како високог диверзитета врста, тако и високог генетичког диверзитета, који опада ка унутрашњости Европе. Комплексним процесом раздвајања Афричке и Европске тектонске плоче настала су Иберијско, Апенинско и Балканско полуострво. Климатске промене током протеклих 50 милиона година, уз смене ледених доба у току последња 2 милиона година утицале су на сталну промену географске дистрибуције врста поменутих полуострва, као и на еволуцију нових врста. Полуострва су богата ендемским врстама, док врсте присутне на сва три полуострва показују генетичку диференцијацију популација својствених сваком појединачном полуострву. Планинска топографија полуострва омогућила је опстанак врста током смене ледених доба захваљујући мултиплим рефугијалним областима. Захваљујући рефугијалним зонама на полуострвима су настале мултипле различите генетичке линије што све указује на континуирану дивергенцију и специјацију током протеклих неколико милиона година (Hewitt, 2011; Vujić и сар., 2016).

Поред високог биолошког диверзитета забележеног на полуострвима Медитерана, бројна острва Медитеранског архипелага (преко 11800) показују високу биолошку разноврсност и присуство већег броја ендемских врста (Blondel и сар., 2010; Vujić и сар., 2016).

Род *Merodon* је најзаступљенији у области Медитерана. Широка дистрибуција је везана за високу заступљеност биљака са подземним органима у којима се развијају ларве ових врста (Hurkmans, 1993; Popov и сар., 2001; Ricarte и сар., 2008; Andrić и сар.,



2014). Већи број врста рода насељавају Медитеранска острва. Највише података постоји за острва источног дела Медитерана, где је забележено присуство 57 врста овог рода од којих су седам ендеми острва Родос, Крит, Наксос, Андрос, Пелопонез (полуострво, али у биогеографском смислу може се посматрати као острво) и Кипар (Vujić и сар., 2016).



3. Циљеви

Решавање таксономског статуса популација у оквиру *Merodon aureus* групе је од посебног интереса за конзервацију биодиверзитета. Очекује се да ће анализа молекуларног диверзитета групе додатно потврдити статус описаних врста и да ће допринети утврђивању криптичних врста и популација са еволуционим значајем за конзервацију. Циљеви овог истраживања су следећи:

- 1. Израчунавање параметара молекуларног диверзитета унутар и између врста *Merodon aureus* групе;**
- 2. Предлагање граница врста између таксона у оквиру *Merodon aureus* групе врста на основу дивергенције секвенци цитохром ц оксидазе I (COI) и 28S рРНК гена;** С обзиром на присуство криптичних таксона, очекује се да *M. aureus* група обухвата већи број различитих врста сирфида. Како су криптичне врсте у оквиру групе практично неодвојиве на основу морфологије, утврђивање молекуларне дивергенције у интеграцији са подацима других релевантних дисциплина би могло да помогне у решавању таксономије групе.
- 3. Предлагање вероватног филогеографског сценарија *Merodon aureus* групе врста и објашњење специјације таксона унутар *M. aureus* групе;** Претпоставља се да су драматичне климатске промене током Плеистоцена имале утицај на процес диверзификације унутар *M. aureus* групе. Смене периода глацијација и интерглацијација могли су условити раздавајање популација и прекид протока гена уз брзу диверзификацију криптичних таксона.
- 4. Формирање базе секвенци COI и 28S рРНК гена таксона *Merodon aureus* групе врста;** Очекује се да ће формирање базе секвенци за врсте *M. aureus* групе допринети општем увиду у варијабилност секвенци COI и 28S рРНК гена између криптичних врста рода *Merodon*.



4. Радне хипотезе

Имајући у виду претходна сазнања о примени молекуларних маркера у таксономији сирфида, као и значај молекуларног диверзитета у укупном биолошком диверзитету постављене су следеће радне хипотезе приказаног истраживања:

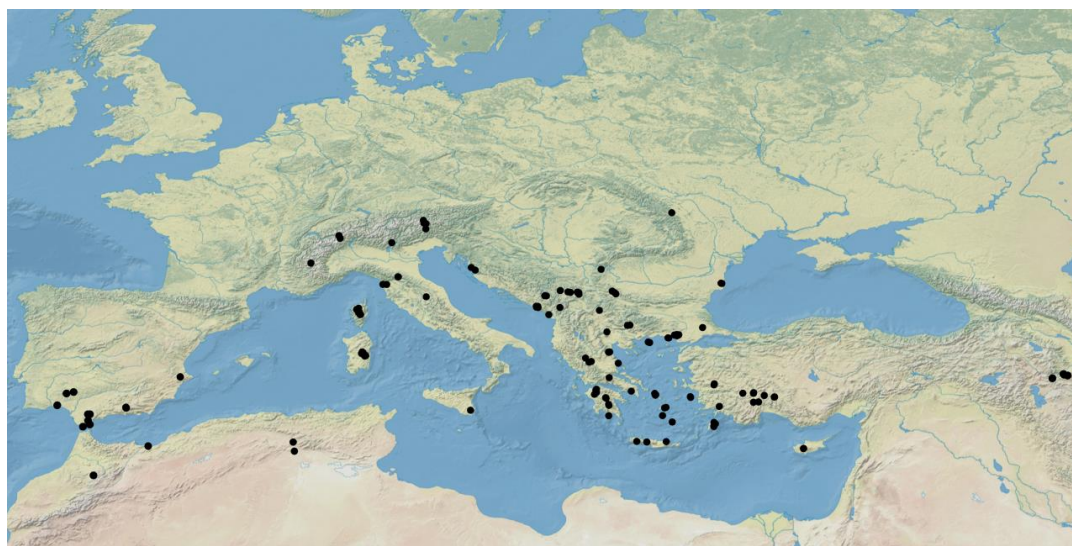
- Варијабилност секвенци COI гена указује на диверзификацију *Merodon aureus* групе на већи број криптичних врста.
- Варијабилност секвенци 28S рРНК гена може бити значајна као допуна уз дивергенцију секвенци COI гена у таксономији неких од таксона *Merodon aureus* групе.
- COI хаплотипови су јединствени за хипотетичке врсте *Merodon aureus* групе.
- Географске баријере и прекид протока гена су условили брзу молекуларну диверзификацију *Merodon aureus* групе.
- Процес специјације врста у оквиру *Merodon aureus* групе одвијао се под утицајем драстичних климатских промена у прошлости.



5. Материјал и методе

5.1. Материјал

Узорковање јединки сирфида *Merodon aureus* групе вршено је током четири године, од 2012. до 2015., у оквиру теренских истраживања чланова Лабораторије за истраживање и заштиту биодиверзитета, Департмана за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду (легатори: А. Вујић, С. Раденковић, С. Шимић, З. Недељковић, Ј. Ачански, С. Веселић, М. Миличић, Ј. Ликов, Д. Полић, Љ. Шашић, Д. Радишић, Б. Ивошевић, G. Ståhls, J. Devalez, K. Minachilis, A. Ssymank, W. van Steenis, A. Varendregt, P. Tsalkatis, M. de Coursy, T. Petanidou, R. Nayat, A. Uzal, A. Uzun, O. Demirozer). Област узорковања обухватала је четрнаест земаља Јужне Европе (Шпанија, Италија, Хрватска, Црна Гора, Швајцарска, Аустрија, Србија, Румунија, Бугарска, Македонија, Грчка, ¹Румунија, Турска, Кипар), Иран (Азија) и Мароко (Африка) (Сл. 2). Сакупљање је вршено помоћу ентомолошке мрежице док су се јединке храниле на цвећу или мировале на лишћу приземне вегетације или на тлу. Сакупљане су само адултне јединке. Укупно 797 јединки сирфида *M. aureus* групе сакупљено је за потребе проучавања молекуларног диверзитета групе. Иницијалну идентификацију материјала је обавио Анте Вујић. Сакупљени материјал чува се у збирци Природно-математичког факултету у Новом Саду, FSUNS. Подаци о јединкама су приказани у Табели П1 у Прилогу 1.



Слика 2. Област узорковања са означеним локалитетима узорковања. / *Figure 2. Sampling area with marked sampling localities.*

¹ Део територије Румуније се налази у Средњој Европи.



5.2. Методе

5.2.1. Изолација геномске ДНК

Геномска ДНК јединки сирфида изолована је методом SDS (натријум додецил сулфат) екстракције коју су описали Chen и сар. (2010), уз извесне измене протокола. Од хемикалија коришћен је претходно припремљен дигестиони пуфер, раствор протеиназе К, фенол, хлороформ/изоамил алкохол, апсолутни и 70% етанол.

Дигестиони пуфер је садржао SDS (анјонски детерцент који има улогу у разградњи ћелијске мембране, али делује и као инхибитор ДНаза, и утиче на денатурацију протеина), трис(хидроксиметил)амниометан хидрохлорид (TrisHCl) (чија улога је у одржавању оптималне рН вредности), етилендиаминтетрасирћетну киселину (EDTA) (која везује јоне магнезијума и тиме инхибира деловање активности већине ДНаза) и натријум хлорид (NaCl) (који утиче на очување структуре ДНК молекула, олакшава депротеинизацију, односно одстрањивање протеина). Уз механичко разарање ткива дигестиони пуфер утиче на лизу ћелија и ослобађање ДНК. Раствор протеиназе К има улогу у дигестији интактних и денатурисаних протеина. Фенол и хлороформ/изоамил алкохол имају особину да растварају протеине, али не и ДНК молекуле, па се на основу тога врши ослобађање изолата од протеина. Етанол се користи у циљу преципитације ДНК која се услед слабе растворљивости у етанолу издваја у виду талога, док се са етанолом одстрањују остаци соли, нуклеотиди, аминокиселине и други молекули мале молекулске масе (Surzyski, 2000).

За изолацију геномске ДНК узорак осоликних мува употребљено је ткиво средње и задње ноге инсеката. Ткиво је измрвљено у киветици уз додатак 500µl SDS пуфера (0,5% (w/v) SDS, 200mM Tris, 25mM EDTA, 250mM NaCl). Киветице са узорцима су потом инкубиране у сувом термоблоку на 37°C током 1h како би се обезбедили оптимални услови за хемијску разградњу ткива. Након првог дела инкубације, у сваку киветицу је додато по 5µl протеиназа К раствора концентрације 40mg/ml, инкубација је настављена на 50°C (што је оптимална температура деловања ензима) током 1h. Добијен хомогенат је екстрахован са 240µl фенол/хлороформ/изоамил алкохола (25:24:1) и центрифугиран на 12000g, 10min. Екстракција је поновљена са 240µl хлороформ/изоамил алкохола (24:1). У наредном кораку вршена је ДНК преципитација додавањем 500µl хладног апсолутног етанола уз центрифугирање на 12000g, 15min при температури 4°C. Талог је испиран два пута са по 150µl 70% етанола уз



центрифугирање на 12000g током 3min (4°C), како би се уклонили остаци соли. Пелет је сушен 30min на 37°C, а потом је растворен у 30μl 0,1xTE пуфера (pH8).

Након 24h од изолације ДНК одређене су концентрације изолата помоћу BioSpec-напо апарата (Shimadzu, Japan), а на основу мерења апсорбанце на 260nm. Чистоћа узорака је одређена мерењем односа апсорбанци на 260nm и 280nm (A_{260}/A_{280}). Вредности апсорбанце испод 1,8 указују на контаминацију протеинима и/или фенолом, док вредности изнад 1,8 указују на присуство РНК (Stephenson, 2010). Вредности A_{260}/A_{280} у опсегу од 1,7-2,0 су показатељ оптималног квалитета изоловане ДНК (Glasel, 1995).

5.2.2. Умножавање и секвенционирање митохондријалних и нуклеарних генских региона

Како је један од циљева овог истраживања раздвајање врста, умножене су секвенце митохондријалног COI и нуклеарног 28S рРНК гена. ITS2 није одабран за анализу иако се претходно показао као значајан за раздвајање врста код сирфида (Nedeljković и сар., 2013; Naarto и Ståhls 2014). Наиме, ITS2 се показао као тежак за амплификацију код врста из *Merodon aureus* групе с обзиром да су на агарозним геловима као продукти амплификације добијани најчешће слаби и/или дупли бендови (лично искуство). Насупрот томе 28S рРНК ген се показао као једноставан за амплификацију и значајан у решавању таксономије *M. luteomaculatus* комплекса (Radenković и сар., 2018).

Два региона COI гена, 3' и 5' крај, и Д2-3 регион 28S рРНК гена умножени су ланчаном реакцијом полимеразе (PCR - *Polimerase Chain Reaction*). PCR реакција се одвијала у укупној запремини од 25μl. Реакциона смеша је укључивала 1x PCR *Taq* пуфер (ThermoScientific, Lithuania), 2mM MgCl₂, 0,1mM сваког нуклеотида, 1,25U *Taq* полимеразе (ThermoScientific, Lithuania), 5pmol сваког прајмера, 50-100ng ДНК и воду високе чистоће. У случајевима где је концентрација ДНК у узорку била јако ниска или није било могуће добити производ амплификације, реакција је поновљена применом 1x *Dream Taq* пуфера (ThermoScientific, Lithuania) (10x пуфер садржи 20 mM MgCl₂) и 1,25U *Dream Taq* полимеразе (ThermoScientific, Lithuania), с обзиром да овај ензим показује већу специфичност у реакцији чиме се повећава успешност амплификације. Реакција умножавања региона на 3' крају COI гена се одвијала на следећи начин: почетно раздвајање ланаца на 95°C током 2min; након чега је следило 29 циклуса од



којих се сваки састојао од раздвајања ланаца у трајању од 30s на 94°C, везивања прајмера са комплементарним секвенцама ДНК ланца у трајању од 30s на 49°C и синтезе ДНК ланца током 2min на 72°C; и на крају завршна синтеза на 72°C током 8min. Реакција умножавања 5' COI и Д2-3 регион 28S се састојала из следећих фаза: почетно раздвајање ланаца на 94°C током 3min; након чега је следило 29 циклуса од којих се сваки састојао од раздвајања ланаца у трајању од 30s на 94°C, везивања прајмера са комплементарним секвенцама ДНК ланца у трајању од 45s на 50°C и синтезе ДНК ланца током 1min на 72°C; и на крају завршна синтеза на 72°C током 8min. Умножавање претходно наведених генских региона је вршено помоћу Eppendorf Personal Thermocycler и Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cyler машине. За умножавање и секвенционирање 3' краја COI употребљени су комерцијани прајмери C1-J-2183 (познат под називом Jerry) и TL2-N-3014 (познат по називом Pat) (Simon и сар., 1994), за 5' крај COI (баркод секвенца) употребљени су прајмери LCO1490 и HCO2198 (Folmer и сар., 1994), а за Д2-3 регион 28S рРНК употребљени су F2 и 3DR (Belshaw и сар., 2001) (Таб. 1).

Табела 1. Универзални прајмери коришћени за умножавање 3' и 5' региона COI гена и Д2-3 региона 28S рРНК гена код инсеката. / *Table 1. Universally conserved primers for amplification of 3' and 5' regions of COI gene and D2-3 region of 28S rRNA gene in insects.*

	Прајмер / <i>Primer</i>	Секвенца прајмера / <i>Primer sequence</i>	Извор / <i>Reference</i>
3' крај COI / 3' end of COI	C1-J-2183 (alias Jerry)	5'-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3'	Simon и сар., 1994
	TL2-N-3014 (alias Pat)	5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'	Simon и сар., 1994
5' крај COI / 5' end of COI	LCO-1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	Folmer и сар., 1994
	HCO-2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	Folmer и сар., 1994
Д2-3 регион 28S / D2-3 region of 28S	28S F2	5-AGAGAGAGTTCAAGAGTACGTG-3'	Belshaw и сар., 2001
	28S 3DR	5'-TAGTTCACCATCTTTCGGGTC-3'	Belshaw и сар., 2001

Квалитет PCR продуката је утврђен електрофоретски на стандардном 1,5% агарозном гелу, при константном напону од 100V. Гел је припреман растварањем одговарајуће количине агарозе у 1xTAE пуферу (2M тризма база, 1M глацијална сирћетна киселина, 0,5M EDTA рН8,0) или 1xTBE пуферу (0,1M тризма база, 0,1M борна киселина, 0,05M EDTA) и додатком Roti-Safe GelStain (Carl Roth GmbH+Co. KG,



Немачка) боје за гел. Боја омогућава визуелизацију PCR продуката на UV транслуминатору (Vilber Lourmat, Немачка). Као пуфер за електрофорезу коришћен је онај пуфер који је коришћен за припрему гела. За одређивање приближне величине PCR продуката у гел је, поред узорака, лодиран и маркер GeneRuler 100bp (ThermoScientific, Литванија).

PCR продукти су ензимски пречишћени употребом ензима егзонуклеаза I и алкалне фосфатазе шампа (ThermoScientific, Lithuania) и потом секвенционирани у 5'-3' правцу са *forward* PCR прајмером. Ензимско пречишћавање је неопходно да би се уклонили остаци прајмера и нуклеотида који могу утицати на појаву нејасног сигнала приликом секвенционирања (у виду дуплих бендова на хроматограму секвенци). Егзонуклеаза I деградира прајмере хидрлизом у 5'-3' смеру, док алкална фосфатаза уклања фосфатне групе са нуклеотида односно врши дефосфорилацију. Пречишћени PCR продукти се користе за реакцију секвенционирања применом BigDye Terminator v.3.1 cycle комплета за секвенционирање (Applied Biosystems, Foster City, Ca, SAD) уз електрофорезу на ABI3730xl DNA Analyzer секвенцеру (Applied Biosystems, Foster City, Ca, SAD) у Лабораторији за услуге секвенционирања Финског Института за Молекуларну Медицину (ФИММ), Хелсинки, Финска.

5.2.3. Умножавање и детекција генетичке варијабилности применом ISSR маркера

Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) су региони генома ограничени микросателитским секвенцама. PCR амплификација ових региона са појединачним прајмером (микросателитска секвенца) резултује већим бројем продуката који се користе као мултилокусни маркер систем у проучавању генетичке варијабилности различитих организама.

Због ограничених финансијских могућности ISSR маркери су тестирани само на једном комплексу врста *Merodon aureus* групе, на *M. luteomaculatus* комплексу.

Тетрануклеотидни поновак (GACA)₄ је коришћен као прајмер за PCR амплификацију ISSR фрагмената. PCR реакција се одвијала у укупној запремини од 25μl. Реакциона смеша је укључивала 1x PCR *Taq* пуфер (ThermoScientific, Lithuania), 2mM MgCl₂, 0,1mM сваког нуклеотида, 1,25U *Taq* полимеразе (ThermoScientific, Lithuania), 5pmol прајмера, 50-100ng ДНК и воду високе чистоће. Амплификација је вршена под условима описаним у Kehlmaier и Assmann (2010): почетно раздвајање ДНК



ланаца на 94°C током 5min, након чега следи 26 циклуса који се састоје из: раздвајања ланаца у трајању од 1min на 94°C, везивања прајмера са комплементарним секвенцама ДНК ланца у трајању од 1min на 52°C, и синтезе ДНК ланца током 3min на 72°C; и завршна синтеза ДНК током 10min на 72°C.

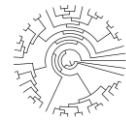
Анализа геномског отиска (енг. genomic fingerprints) ISSR-а вршена је електрофорезом на стандарном не-денатуришућем 6% полиакриламидном гелу (РАА) (Sambrook и Russel, 2001).

Електрофореза је вршена на Hoefer (САД) серија SE600 вертикалном електрофоретском систему уз хлађење помоћу MULTITEMP II термостатског циркулатора (LKB Bromma, Шведска). За припрему гела коришћен је 10x TBE пуфер, 30% акриламид+бисакриламид смеша (29:1), као и 10% амонијум-персулфат и тетраметилетилендиамин (TEMED) који омогућавају полимеризацију гела. Пре лодирања PCR продукти су мешани са бојом за лодирање *6x DNA Loading Dye* (ThermoScientific, Литванија). Коришћено је 5ul PCR продукта и 2ul боје. Поред тога на гел је лодирао и маркер *Gene Ruler DNA ladder mix* (ThermoScientific, Литванија), на основу кога је утврђена величина раздвојених дволанчаних ДНК фрагмената и вршено читавање гела.

За електрофорезу је коришћен 1xTBE пуфер. Електрофореза је текла при константном напону од 80V током 4h и 30min. По завршетку електрофорезе РАА гелови су бојени модификованом методом сребрног бојења (Кошић Тубић, 2014). Гелови су најпре фиксирани у смеши за фиксирање (10% етанол и 5% глацијална сирћетна киселина) током 30min. Након тога је вршено испирање у дестилованој води (два пута по два минута). У наредном кораку гелови су бојени у 0,12M раствору сребро нитрата (AgNO_3) током 20min у мраку, а потом испрани дестилованом водом (два пута по 10s). Гелови су затим потопљени у развијач (0,375M натријум хидроксид - NaOH, 0,4% формалин, 0,22mM натријум борхидрат - NaBH_4) и благо мућкани до појаве трака, али не дуже од 20min. Потом су гелови испирани у стоп раствору (0,141M натријум карбонат - Na_2CO_3), а затим у дестилованој води. Гелови су сушени умотани у пластичну фолију на електрофоретском стаклу.

5.2.4. Детекција *Wolbachia* инфекције

За проверу узорака осоликних мува на присуство *Wolbachia* инфекције вршено је тестирање геномске ДНК 1-2 представника сваке врсте *Merodon aureus* групе.



Детекција је била заснована на провери присуства бактеријске ДНК у укупној геномској ДНК узорака сирфида, умножавањем региона 16S рРНК гена бактерије и провером продуката на 1,5% агарозним геловима. Као позитивна контрола коришћена је геномска ДНК *Drosophila melanogaster* изолована из линије 5 Bloomington stock centra <http://flystocks.bio.indiana.edu/Reports/5.html> (ДНК је изолована у оквиру пројекта ОИ 173012). Поред 16S рРНК гена, узорци су тестирани и умножавањем *Wolbachia surface protein* (*wsp*) гена бактерије. За ту сврху, додатна количина геномске ДНК је изолована из абдомена јединки сирфида по процедури која је описана за изолацију ДНК из ногу инсеката.

За умножавање региона 16S рРНК гена бактерије коришћени су прајмери специфични за *Wolbachia*, *Wspecf* (5' CATACCTATTCGAAGGGATAG 3') и *Wspecr* (5' AGCTTCGAGTGAAACCAATTC 3') (Werren и Windsor, 2000). PCR реакција се одвијала у укупној запремини од 25µl. Реакциона смеша је укључивала 1x PCR *Taq* пуфер (ThermoScientific, Lithuania), 1,5mM MgCl₂, 0,25mM сваког нуклеотида, 1,25U *Taq* полимеразе (ThermoScientific, Lithuania), 7pmol сваког прајмера, 50-100ng геномске ДНК и воду високе чистоће. У случајевима где није било могуће добити производ амплификације по описаном протоколу, реакција је поновљена применом 1x *Dream Taq* пуфера (ThermoScientific, Lithuania) (10x пуфер садржи 20 mM MgCl₂) и 1,25U *Dream Taq* полимеразе (ThermoScientific, Lithuania), с обзиром да овај ензим показује већу успешност амплификације. Реакција умножавања региона 16S рРНК гена бактерије се одвијала на следећи начин: 2 циклуса из три корака: почетно раздвајање ДНК ланца на 95°C током 2min, везивање прајмера са комплементарним секвенцама ДНК ланца у трајању од 1min на 60°C и синтеза ДНК ланца током 1min на 72°C; након чега је следило 35 циклуса од којих се сваки састојао од раздвајања ланца у трајању од 30s на 95°C, везивања прајмера у трајању од 1min на 60°C и синтезе ДНК ланца током 45s на 72°C; и на крају завршна синтеза на 72°C током 5min (видети у Werren и Windsor, 2000).

Умножавање *wsp* гена вршено је помоћу *Phire Animal Tissue Direct PCR Master Mix* комплекта (ThermoScientific, Литванија) пратећи упутства произвођача. Комплет садржи *Phire Hot Start II* ДНК полимеразу, специјално дизајнирану са ДНК везујућим доменом који појачава ефикасност полимеразе. Ова полимеразе је и високо резистентна на инхибиторе PCR реакције пореклом из ткива. За PCR су коришћене три комбинације прајмера: 136F/691R комбинација специфична за *Wolbachia* супергрупу А, 81F/522R



специфична за *Wolbachia* супергрупу В и 81F/691R универзална за обе супергрупе (Zhou и сар., 1998). Секвенце прајмера дате су у Табели 2. У првом тестирању, сви узорци су тестирани применом комбинације wsp прајмера специфичне за супергрупу А. Узорци код којих није детектован продукт амплификације или су детектовани мултипли продукти су додатно тестирани wsp комбинацијом прајмера за супергрупу В и/или са универзалном комбинацијом прајмера за обе супергрупе. Умножавање wsp гена се одвијало под условима описаним у Zhou и сар. (1998): почетно раздвајање ДНК ланаца на 94°C током 2min; 35 циклуса од по 3min: 94°C for 1min, 55°C for 1min, 72°C for 1min; завршна синтеза на 72°C у трајању од 10min.

Табела 2. Секвенце коришћених wsp прајмера (Zhou и сар., 1998). /
Table 2. Sequences of used wsp primers (Zhou и сар., 1998).

Прајмер / Primer	Секвенца прајмера / Primer sequence
81F	5'-TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC-3'
136F	5'-TG AAA TTT TAC CTC TTT TC-3'
522R	5'-ACC AGC TTT TGC TTG ATA-3'
691R	5'-AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA-3'

PCR продукти су ензимски пречишћени употребом ензима егзонуклеаза I и алкалне фосфатазе шкампа (ThermoScientific, Литванија). Секвенционирање је вршено у оба правца употребом BigDye Terminator v.3.1 cycle комплета за секвенционирање (Applied Biosystems, Foster City, Ca, SAD) уз електрофорезу на ABI3730xl DNA Analyzer секвенцеру (Applied Biosystems, Foster City, Ca, SAD) у Лабораторији за услуге секвенционирања Финског Института за Молекуларну Медицину (ФИММ), Хелсинки, Финска.

5.2.5. Обрада резултата

5.2.5.1. Израчунавање параметара молекуларног диверзитета

Прва фаза обраде секвенци састојала се у провери квалитета секвенци прегледом добијених хроматограма. Секвенце задовољавајућег квалитета, са јасним пиковима на хроматограму, су укључене у формирање матрица секвенци за сваки од анализираних



генских региона помоћу програма BioEdit 7.2.5. (Hall, 1999). Након мануалног сравњивања (енг. *alignment*), секвенце су по потреби додатно кориговане уколико су уочене грешке у читавању пикова са хроматограма. За сваку матрицу секвенци вршено је израчунавање параметара генетичког диверзитета на основу ДНК полиморфизма у програму DnaSP 5 (Librado и Rozas, 2009). Одређен је број полиморфних позиција (S), број хаплотипова/генотипова (h), диверзитет хаплотипова/генотипова (Hd/Gd), просечан број разлика (K) и диверзитет нуклеотида (Pi). COI хаплотипови и 28S генотипови такође су дефинисани помоћу програма DnaSP 5 (Librado и Rozas, 2009). У циљу анализе дистрибуције генетичког диверзитета унутар и између генетичких врста вршена је анализа молекуларне варијансе (AMOVA) и поређење врста на основу израчунавања Φ_{ST} статистике у програму Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier и Lischer, 2010). За AMOVA анализу коришћена је опција стандардна AMOVA, хаплотипски формат са 1000 пермутација. Некоригована вредност дивергенције секвенци (p дистанца) и најбољи модел супституције за матрице секвенци одређени су у програму MEGA 6 (Tamura и сар., 2013). Модел са најнижом вредношћу *Bayesian Information Criterion* (BIC) је узет као најбољи модел субституције за анализирани секвенце.

5.2.5.2. Конструкција мреже хаплотипова

Приступу базирани на конструкцији мреже хаплотипова укључују популационе процесе (популациона генеалогичка је често са вишеструким гранањима, предачке форме гена постоје са новонасталим, утицај рекомбинација и хибридизације између линија) у приказ веза између хаплотипова. Могу се користити у детектовању рекомбинација, за утврђивање граница врста, потврду начина специјације, раздвајање популационе историје и структуре и проучавање асоцијације генотипа и фенотипа (Posada и Crandall, 2001). Неке од најзаступљених метода конструкције мреже хаплотипова су: *Minimum spanning*, *Median-joining* и метода статистичке парсимоније.

Minimum spanning метода подразумева конструкцију мреже хаплотипова обједињењем свих *Minimum spanning* стабала која се добијају повезивањем хаплотипова тако да нема цикличних веза нити додатих чворова (односе се на неузорковане хаплотипове или оне који су нестали из популације) при чему је укупна дужина стабала (сума дистанци између повезаних хаплотипова) најмања могућа. Ова метода је једноставна за примену али најчешће не задовољава услов највише парсимоније (Bandelt и сар., 1999). *Median-joining* метода почиње спајањем *Minimum*



spanning стабала у мрежу, а на основу критеријума парсимоније додају се медиан вектори који представљају неузорковане хаплотипове уколико се тиме скраћује укупна дужина мреже. Метода је брза, успешно се примењује на великим сетовима података и омогућава анализу карактера са више стања, али подразумева одсуство рекомбинација (Bandelt и сар., 1999). Метода статистичке парсимоније према Templeton и сар. (1992) процењује највећи могући број разлика између хаплотипова који су узроковани појединачним случајевима субституције, док се вишеструке субституције на појединачној позицији занемарују. Најпре се повезују хаплотипови са једном разликом, потом они са две, па са три и процес се наставља све док сви хаплотипови не буду повезани у мрежу или док се не достигне лимит парсимоније (највећи дозвољени број разлика између хаплотипова). Метода омогућава идентификацију рекомбинаната на основу просторне дистрибуције хомоплазија на мрежи. Најчешће се примењује у случају када дивергенција између хаплотипова није висока.

На основу изнетих особина метода конструкције мреже хаплотипова изабрана је *Median-joining* метода (Bandelt и сар., 1999). Мрежа хаплотипова је конструисана помоћу програма PopART (Leigh и Bryant, 2015; <http://popart.otago.ac.nz>). Како програм PopART нема могућност анализе празних позиција (енг. *gap*) или позиција са двосмисленим карактерима (нпр. ?, N, Y, R), пре конструкције 28S мрежа сетови секвенци су модификовани тако да у анализу буду укључене и *gap* позиције (*gap* позиције замењене су идентичним нуклеотидом у свим секвенцама, а који се не појављује у секвенцама које на истој позицији не садрже *gap*).

5.2.5.3. Конструкција филогенетских стабала

Свакој матрици секвенци придружене су одговарајуће секвенце осам врста сирфида као аутгрупе за конструкцију филогенетских стаба. Сва стабла су укореењена на *Platynochaetus setosus* Fabricius, 1794 (подфамилија Eristalinae). Додатне коришћене аутгрупе су *Eumerus amoenus* Loew, 1848, *E. pulchellus* Loew, 1848, *E. pusillus* Loew, 1848, *Merodon albifasciatus* Macquart, 1842, *M. desaturinus* Vujić, Šimić et Radenković, 1995, *M. equestris* (Fabricius, 1794) и *M. ruficornis* Meigen, 1822 (Табела 3). Све врсте коришћене као аутгрупе припадају трибусу Eumerini (подфамилија Eristalinae). Конструкција стабла је вршена применом три различите методе: методе парсимоније (MP), *Maximum-likelihood* (ML) и *Neighbor-joining* (NJ) методе. MP и ML представљају методе анализе карактера, док је NJ метода дистанце.



Анализа парсимоније вршена је помоћу програма NONA (Goloboff, 1999) имплементираних у програм Winclada (Nixon, 2002) применом *the heuristic search* протокола са 1000 понављања (mult*1000), задржавајући 100 стабала по циклусу (hold/100), максималним бројем стабала подешеним на 100 000 и укљученом опцијом *tree-bisection-reconnection branch swapping*. Статистичка подршка топологије конструисаних филогенетских стабала процењена је применом непараметријске *bootstrap* методе са 1000 понављања у програму Winclada. Метода парсимоније има за циљ конструкцију филогенетског стабла са најмањом могућом укупном дужином, односно са најмањим бројем еволуционих промена које су потребне током еволуционог времена да се добије филогенетско стабло. Могућа стабла се пореде и сваком додељује одређена вредност, док се као оптимално, или стабло највеће парсимоније (енг. *the most parsimonious tree*) узима оно са најмањим бројем промена. Предност ове методе јесте јасан критеријум оптималности, једноставност и могућност утврђивања статистичке подршке кладама, али је главна слабост немогућност да се при конструкцији стабла узме у обзир било какво знање о еволуционом моделу. Додатно код ове методе се нарочито често јавља проблем неоснованог повезивања дугих грана (енг. *long-branch attraction*) (Makarenkov и сар., 2006; Yang и Rannala, 2012).

Филогенетска стабла добијена ML анализом конструисана су помоћу програма RAxML 8.2.8 (Stamatakis, 2014) посредством CIPRES *Science Gateway* веб портала (Miller и сар., 2010) по *general time-reversible (GTR)* моделу еволуције са гама дистрибуцијом (Rodriguez и сар., 1990) по препоруци аутора програма, док је статистичка подршка за класе процењена непараметријском *bootstrap* методом са 1000 понављања. За приказ стабла коришћен је програм FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). ML метода конструкције филогенетских стабала додељује одређени степен вероватноће мутационим догађајима, пореди могућа филогенетска стабла на основу њихове способности да предвиде уочене податке и одабира стабло које има највећу вероватноћу продуковања анализираних секвенци. Метода узима у обзир модел субституције, а функција вероватноће може да се користи за процену примењивости модела еволуције и тестирање биолошких хипотеза (нпр. молекуларни сат). До развоја савремених софтвера метода је била временски веома захтевна (Makarenkov и сар., 2006; Yang и Rannala, 2012). Данас су, међутим, у широкој примени програми који омогућавају брзу анализу и конструкцију ML стабала попут RAxML и PhyML.



Додатно, филогенетска стабла су конструисана и применом NJ методе (Saitou и Nei, 1987) израчунавањем еволуционе дистанце по *Tamura-Nei* (Tamura и Nei, 1993) моделу са гама дистрибуцијом (TN93+G), а за *M. chalybeus* комплекс узимајући у обзир да је део позиција еволуционо непроменљив (TN93+G+I). Као најбољи модел супституције за све матрице секвенци одређен је GTR, док је TN93 био први иза њега. Како анализа нема опцију за примену GTR модела, коришћен је TN93 модел. Анализа је извршена помоћу програма MEGA6 (Tamura и сар., 2013). NJ метода се убраја у методе дистанци које израчунавају дистанце између парова секвенци и формирају матрицу дистанци која се онда користи за конструкцију филогенетског стабла. У случају NJ методе поступак почиње са звездастим стаблом из кога се бирају парови таксона на основу дистанце и повезују све док се не добије потпуно разрешено стабло. Повезивање се врши тако да се добије што краће стабло (Makarenkov и сар., 2006; Yang и Rannala, 2012). Предност методе је што је брза и погодна за велике сетове секвенци које имају низак ниво дивергенције. Метода није погодна за високо дивергентне секвенце и матрице секвенци са великим бројем *gap* позиција (Yang и Rannala, 2012). Програм MEGA је посебно ефикасан за конструкцију NJ стабала (Tamura и сар., 2013).

Табела 3. Списак врста коришћених као аутгрупе за конструкцију филогенетских стаба. / *Table 3. List of species used as outgroups for phylogenetic tree constructions.*

ДНК код / DNA ID	Врста / Species	Пол / Gender	Локалитет / Locality
AU740	<i>Platynochaetus setosus</i> Fabricius, 1794	♂	у близини Соргина, Сицилија, Италија / near Sortino, Italy
AU735	<i>Eumerus pulchellus</i> Loew, 1848	♂	Роуд Трик Панорамика, Малта / Roud Triq Panoramika, Malta
AU737	<i>Eumerus pusillus</i> Loew, 1848	♂	у близини Белпаса, Сицилија, Италија / near Belpasso, Italy
AU736	<i>Eumerus amoenus</i> Loew, 1848	♂	виа Месина, Катанија, Италија / via Mesinia, Catania, Italy
AU189	<i>Merodon albifasciatus</i> Macquart, 1842	♂	Крит, Ретимон, Грчка / Crete, Retimon, Greece
Y2078	<i>Merodon desuturinus</i> Vujić, Šimić et Radenković, 1995	♀	Јасле-Чукара, Копаоник, Србија / Jasle-Čukara, Kopaonik, Srbija
Y690	<i>Merodon equestris</i> (Fabricius, 1794)	♂	у близини Аскола, Финска / near Askola, Finland
Y2077	<i>Merodon ruficornis</i> Meigen, 1822	♂	Сушичко језеро, Дурмитор, Црна Гора / Sušičko jezero, Durmitor, Crna Gora



5.2.5.4. Утврђивање граница између потенцијалних врста

Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) програм (Puillandre и сар., 2012) разврстава секвенце у групе, хипотетичке врсте, на основу дистанци између парова секвенци које се пореде. У првом кораку програм разврстава вредности дистанци за парове секвенци по растућем редоследу. Затим израчунава криву промене вредности дистанци и детектује пикове на криви који одговарају празнинама у дистрибуцији дистанци, а вредности дистанци које одговарају пиковима узима као вредност баркод празнине (енг. *barcode gap*). Ширина баркод празнине X се претходно задаје као и опсег максималних вредности дистанце унутар врста (P_{\min} означава најмању одабрану вредност из опсега вредности дистанци које тестирамо, а P_{\max} највећу) у оквиру кога се тражи баркод празнина. Када детектује баркод празнину програм врши разврставање секвенци у групе, потенцијалне врсте. Групе се бирају тако да су дистанце између секвенци различитих група увек веће од дистанцене баркод празнине и тако да за сваку секвенцу сваке групе постоји најмање једна друга секвенца у истој групи таква да им је дистанца мања од дистанце баркод празнине. На овај начин детектовањем једне баркод празнине се врши примарно груписање. Како дистанца баркод празнине може да се разликује за различите групе, поступак се понавља за сваку примарно добијену групу и врши секундарно груписање при чему поступак може и даље да се настави до момента кад више није могућа подела. Овај део анализе назива се поновљено груписање.

Програм има могућност анализе сирових секвенци за које самостално израчунава вредности дистанце (некоригована p дистанца, Jukes-Cantor и Kimura 2-*parameter* (K80)) или се анализа врши на основу претходно задатих матрица дистанци. У овом истраживању за ABGD анализу коришћене су матрице некоригованих p дистанци и матрице дистанци одређене по *Tamura 3-parameter* моделу (T92) (Tamura, 1992) (или TN93 за *M. ambiguus* комплекс) који је одређен на основу процене најбољег модела нуклеотидне супституције (описано у делу 5.2.5.1.) у програму MEGA 6 (Tamura и сар., 2013). Додатно, анализирани су и матрице секвенци применом *Kimura 2-parameter* (K80) модела (Kimura, 1980) за израчунавање дистанци између парова секвенци. Анализе су вршене према препорученим подешавањима ($P_{\min}=0.001$, $P_{\max}=0.1$, Steps =10, X (relative gap width) =1.5, Nb bins =20).

ABGD метода је одабрана због једноставности примене и могућности истовременог тестирања више граничних вредности дистанци, али се поред ове методе често користе и неке друге попут: *Generalized Mixed Yule Coalescent* (GMYC; Pons и



cap., 2016; Fujisawa и Barraclough, 2013), *Barcode Index Number System* (BIN; Ratnasingham и Hebert, 2013) и мрежа статистичке парсимоније (TCS; Templeton и cap., 1992; Clement и cap., 2000). GMYC је приступ заснован на моделу чији је циљ да утврди највероватније решење за граничну вредност између стопе гранања (специјације) и догађаја коалесценције на филогенетском стаблу. Метода је осетљива на избор почетног филогенетског стабла, временски је захтевна и има слабе перформансе за модел вишеструких граничних вредности. Приступ заснован на BIN систему се састоји из три фазе: дефинисање прелиминарних граница врста применом граничне вредности од 2,2%, Марков кластеровање са циљем да се побољша предвиђање граница врста и избор најпоузданије шеме кластеровања. TCS је метода статистичке парсимоније са граничном вредношћу (90%-99%) у којој се повезују парови секвенци са најнижом генетичком дистанцом све до достизања граничне вредности дистанце. Што је већа гранична вредност потребан је мањи број корака да би се достигла, док је број препознатих хипотетичких врста већи.

5.2.5.5. Анализа ISSR профила

Помоћ у анализи ISSR профила пружила је др Наташа Кочиш Тубић.

Очитавање ISSR профила са PAA гелова вршено је само на дужинама где су траке могле бити очитане конзистентно за све анализиране узорке. На почетку је претпостављено да свака амплификована трака представља појединачни локус. Фрагменти (траке) су оцењени као присутни=1 и одсутни=0, на основу чега је формиран бинарни матрикс коришћен у даљој анализи. Програм FreeTree (Pavlicek и cap., 1999) намењен конструкцији и *bootstrap* анализи филогенетских стабала на основу бинарних података коришћен је за конструкцију и представљање *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean* (UPGMA) стабла на основу Nei и Li (1979) коефицијента генетичке дистанце. Статистичка подршка кластера је израчуната *bootstrap* методом са 5000 понављања. За приказ UPGMA стабла коришћен је програм TreeView (Page, 1996). AMOVA је урађена у програму Arlequin 3.5.1.3. Генетичка структурираност *Merodon luteomaculatus* комплекса је процењена применом софтвера STRUCTURE ver. 2.3.4 (Falush и cap., 2000) при чему је за генотипске класе претпостављено да се састоје од хаплоидних алела (Oliveira и cap, 2012). Примењен је *admixture ancestry* модел са корелисаним фреквенцијама. Анализа је рађена у пет понављања за сваку задату вредност K (претпостављен број генетичких кластера) од 1 до 10 и са *burn-in* дужином подешеном на 20000, и 200000 *Markov chain Monte Carlo*



(МСМС) понављања. ΔК метод по Evanno и сар. (2005) базиран на величини (стопа) промене између две К вредности је коришћен за одређивање највероватнијег броја генетичких кластера (К). За графички приказ STRUCTURE резултата коришћен је CLUMPAК софтвер (Kopelman и сар., 2015).

5.2.5.6. Анализа секвенци 16S рРНК гена и wsp гена *Wolbachia*

Секвенце 16S рРНК гена су ручно сравњене, док су секвенце wsp гена *Wolbachia* сравњене применом L-INS-I стратегије (прецизна и спора, за до 200 секвенци) у програму MAFFT (Katoh и Standley, 2013; доступно на: <https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). Припадност секвенци *Wolbachia* су проверене поређењем са *Nucleotide collection database*, секвенционом базом података Националног центра за биотехнолошке информације (енг. *National Center for Biotechnology Information* (NCBI); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) применом *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Додатно, wsp секвенце су такође проверене поређењем са *Wolbachia* MLST базом података (Baldo и сар., 2006). Резултати тестирања приказани су у форми табеле са означеним узорцима код којих је *Wolbachia* детектована применом 16S, *wsp* или оба гена.

Да би дефинисали *Wolbachia* супергрупу присутну код врста *Merodon aureus* групе конструисано је 16S ML стабло. Стабло је конструисано применом програма RAxML 8.2.8 (Stamatakis, 2014) посредством CIPRES *Science Gateway* веб портала (Miller и сар., 2010) по GTR (*general time-reversible*) моделу еволуције са гама дистрибуцијом (Rodriguez и сар., 1990). Статистичка подршка за кладе процењена је непараметријском *bootstrap* методом са 1000 понављања. Анализа је укључивала и 14 додатних 16S секвенци А и В *Wolbachia* супергрупе (Таб. П1 у Прилогу 5). Као аутгрупе коришћене су секвенце 16S рРНК гена пет врста α-Proteobacteria: *Ehrlichia canis*, *Cowdria ruminantium*, *Anaplasma marginale*, *Rickettsia prowazekii*, *Sinorhizobium meliloti* (приступни бројеви у Банци Гена (GenBank): M73326, AF069758, M60313, M21789, M21789, X67222), једна врста γ-Proteobacteria - *Escherichia coli* (приступни број у Банци Гена: E05133) на коју је стабло укореењено.

Хаплотипови wsp гена су дефинисани помоћу програма DnaSP 5 (Librado и Rozas, 2009). Распоред хаплотипова приказан је на ML стаблу *Merodon aureus* групе конструисаном по претходно образложеној методи применом само секвенци тестираних на *Wolbachia* инфекцију.



6. Резултати

Геномска ДНК је изолована за укупно 797 узорака адултних јединки сирфида *Merodon aureus* групе, док је за још три (X19, X20, X21) употребљена ДНК изолована у истраживању Mengual и сар., (2006). Концентрација изоловане ДНК је била најчешће у опсегу 25-100ng/ul, али су забележене и веома ниске концентрације од свега ~1ng/ul, као и високе до ~245ng/ul. Вредности апсорбанце $A_{260/280}$ су најчешће биле у опсегу 1,7-2,3, односно нешто више од оптималног опсега вредности чистоће ДНК (Glasel, 1995). Одступање апсорбанци ($A_{260/280}$) од препоручених вредности није имало значајнији утицај на успешност реакције амплификације. Амплификовани су 3' и 5' региони COI гена, као и Д2-3 регион 28S рРНК гена. Показана је разлика у амплификацији 5' региона COI гена и 28S рРНК гена у односу на 3'COI регион, таква да је за успешну амплификацију 3'COI региона често била потребна нешто виша количина ДНК од 50ng по узорку (75-100 ng) колико је најчешће коришћено за амплификацију прва два региона. Успешност амплификације је била висока, за 3'COI и 5'COI око 99% и за 28S 97,6%. Упркос високој успешности амплификације крајњи избор секвенци укључених у анализу зависио је од квалитета продукованих секвенци. Додатно у даљој анализи укључени су само узорци за које су успешно продуковане секвенце оба краја (3' и 5') COI гена. За овако одређен сет узорака такође су анализиране успешно продуковане секвенце 28S рРНК гена. Укупно је анализирано 718 комбинованих 3'COI и 5'COI секвенци и 665 секвенци 28S рРНК гена.

Број анализираних секвенци (узорака) по врсти се разликовао у зависности од дистрибуције врсте, али је често зависио и од успешности сакупљања, односно заступљености одређене врсте у укупном узорку. Додатно, број узорака је био у просеку већи за врсте код којих је током прелиминарних истраживања показана висока генетичка варијабилност. У највећем броју случајева врсте су представљене са најмање 5 узорака, осим у случају врста *M. carpathicus* sp. n. (два), *M. naxius* (три) и *M. ortus* (четири). За поменуте три врсте мали број узорака је резултат непоклапања момента узорковања са периодом значајније активности врсте и тешкоће са прикупљањем материјала на појединим локацијама (на пример Иран). Насупрот томе за анализу широко распрострањене врсте, *M. aerarius*, коришћено је чак 77 узорака.

Резултати анализе представљени су најпре по подгрупама и комплексима врста. У неким случајевима анализама је обухваћена цела подгрупа (*M. aureus* подгрупа, *M.*



dobrogensis подгрупа), док су у другим случајевима подгрупе раздвојене на комплексе врста (у оквиру *M. cinereus* подгрупе посебно су анализирани *M. cinereus* комплекс и *M. atratus* комплекс) или групе комплекса (*M. bessarabicus* подгрупа је подењена на групу морфолошки сличних комплекса врста *M. bessarabicus*/*M. sapphous*/*M. ambiguus* комплекси и *M. luteomaculatus* комплекс) са циљем да се омогући једноставнији преглед резултата с обзиром на количину почетних података. Након тога су представљени сумарни резултати за целу *Merodon aureus* групу.

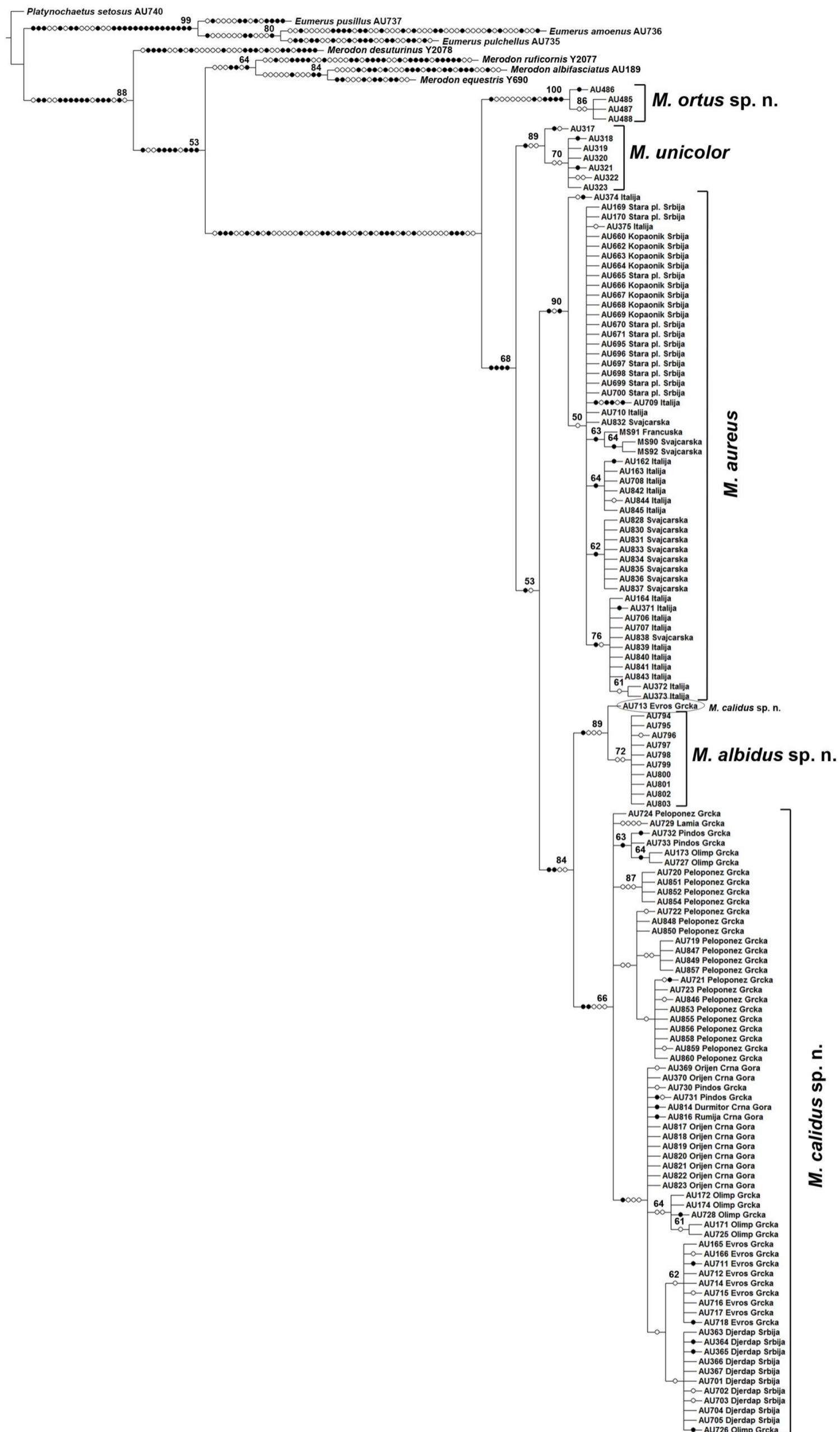
У оквиру комплекса врста генетички резултати су указали на могуће постојање нових, до сада неописаних врста, те су оне означене ознаком „sp. n.” поред предложеног имена врсте. Међутим, за исте таксономски статус тек треба да буде потврђен на основу додатних извора података (морфологија, екологија, дистрибуција итд.) како би биле прихваћене и описане као валидне врсте. Према томе, појам „врсте” у овом истраживању има значење молекуларних операционих таксономских јединица (енг. *molecular operational taxonomic units*, MOTUs) (Blaxter и сар., 2005).

На крају поглавља приказани су резултати скрининга на *Wolbachia* инфекцију.

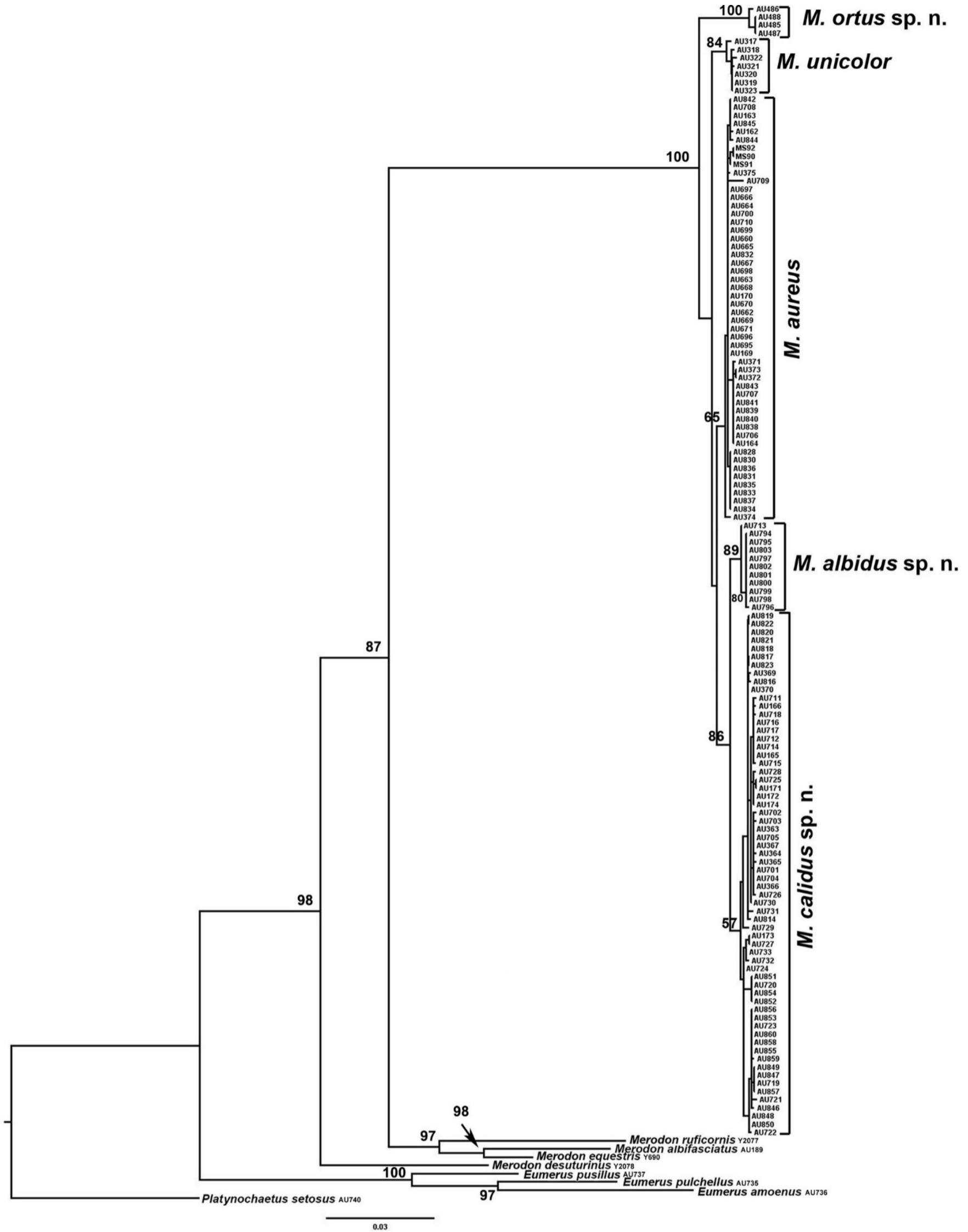


6.1. *Merodon aureus* подгрупа

Анализа COI гена за *M. aureus* подгрупу укључивала је 138 секвенци. Секвенце су добијене комбиновањем фрагмената COI гена секвенционираних одвојено са 3' и 5' краја. Укупна дужина поравнатих секвенци износи 1400 bp. Методом максималне парсимоније добијено је 13 стабала дужине 709 корака (*Consistency index* (CI)=64, *Retention index* (RI)=86) чијим сумирањем је конструисано консензус (*Strict consensus*) стабло дужине 715 корака (CI=63, RI=86) (Сл. 3). Поред тога конструисана су и ML и NJ филогенетска стабла за подгрупу. Све три методе филогентске анализе резултовале су идентичном топологијом стабала уз извесне разлике у вредностима *bootstrap* подршке за поједине кладе (Сл. 3 и Сл. 4, Сл. П1 у Прилогу 2). *M. unicolor* комплекс је раздвојен у две независне кладе од којих је једна пореклом из Шпаније (*M. unicolor*), а друга из Турске (*M. albidus* sp. n.). Слично томе, *M. aureus* комплекс чине три независне кладе од којих једна обухвата јединке планинских области центаралне Европе, Апенинског и Балканског полуострва (*M. aureus*), једна обухвата јединке које су распрострањене јужније уз обалу Јадранског мора, у Грчкој и Ђердапској клисури (*M. calidus* sp. n.) и једна обухвата јединке сакупљене у Ирану (*M. ortus* sp. n.) (Сл. П1 у Прилогу 3). Топологија филогенетских стабала указује на следећи однос: (*M. ortus* sp. n.)+((*M. unicolor*)+(*M. aureus*)+(*M. albidus* sp. n.)+(*M. calidus* sp. n.))). Изузетак чини јединка AU713 пронађена у Грчкој, која морфолошки припада *M. calidus* sp. n., али на основу топологије стабала придружена је *M. albidus* sp. n. клади. Све кладе су дефинисане са *bootstrap* подршком изнад 50.



Слика 3. *Strict consensus* COI стабло од 13 једнаких стабала добијених анализом парсимоније за *Merodon aureus* подгрупу. Дужина: 715 корака, *Consistency index* (CI) 63, *Retention index* (RI) 86. *Bootstrap* вредности ≥ 50 приказане су поред чворова. Испуњени кругови представљају карактере који нису хомоплазије, празни кругови представљају хомоплазије. / *Figure 3. Strict consensus COI tree of 13 equally parsimonious trees of Merodon aureus* subgroup. Length: 715 steps, *Consistency index* (CI) 63, *Retention index* (RI) 86. The bootstrap values ≥ 50 are indicated near nodes. Filled circles represent non-homoplasious characters, open circles are homoplasious characters.



Слика 4. Maximum-likelihood COI стабло за *Merodon aureus* подгрупу. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне класе приказане су поред чворова. / Figure 4. Maximum-likelihood COI tree of *Merodon aureus* subgroup. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.



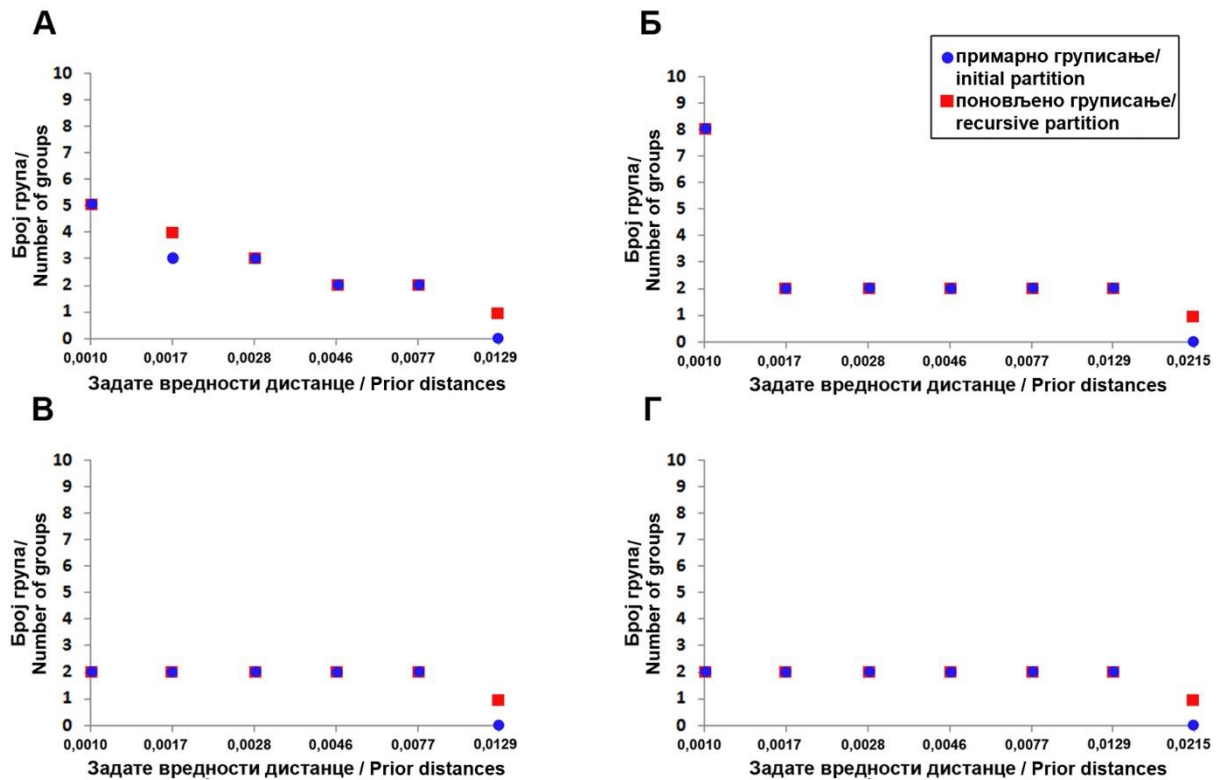
Некориговане просечне вредности дистанци (p - *uncorrected pairwise distance*) између парова врста *M. aureus* подгрупе кретале су се од 1,1% између *M. aureus* и *M. calidus* sp. n. до 2,3% између *M. calidus* sp. n. и *M. ortus* sp. n. Између *M. unicolor* и *M. albidus* sp. n. дистанца је 1,4%. Највиша вредност p дистанце (2,5%) је између *M. ortus* sp. n. и *M. albidus* sp. n. (Таб. 4).

Табела 4. Некориговане просечне вредности дистанци (p - *uncorrected pairwise distance*) између парова врста *Merodon aureus* подгрупе. / *Table 4. Uncorrected pairwise distances between species pairs within Merodon aureus subgroup.*

	1.	2.	3.	4.	5.
1. <i>M. aureus</i>		0,003	0,004	0,003	0,003
2. <i>M. calidus</i> sp. n.	0,011		0,004	0,003	0,002
3. <i>M. ortus</i> sp. n.	0,021	0,023		0,004	0,004
4. <i>M. unicolor</i>	0,010	0,014	0,021		0,003
5. <i>M. albidus</i> sp. n.	0,011	0,008	0,025	0,014	

p дистанца - испод дијагонале; стандардно одступање - изнад дијагонале. / *p distance - below diagonal; standard deviation - above diagonal.*

За утврђивање присуства баркод празнине, секвенце су анализирани применом софтвера ABGD (Puillandre и сар., 2012). Као мера генетичке дивергенције коришћене су матрице некоригованих p дистанци. Анализа је примењена одвојено за *M. aureus* комплекс и *M. unicolor* комплекс. Исте анализе су поновљене коришћењем матрица дистанци израчунатих на основу T92 модела, као најбољег модела нуклеотидне супституције одређеног у програму MEGA 6 (Tamura и сар., 2013) и анализом дистанци израчунатих по K80 моделу употребом ABGD софтвера (Puillandre и сар., 2012). За *M. aureus* комплекс модел нуклеотидне супституције T92 је примењен уз гама (G=0,05) корекцију еволуционе стопе. *M. aureus* комплекс је на основу матрице p дистанци, за вредност дистанце 0,0028, подељен на три групе које одговарају кладама на филогенетским стаблима (*M. aureus*, *M. calidus* sp. n., *M. ortus* sp. n.), док је на основу матрице дистанци T92+G, за вредности дистанце 0,0017 - 0,0129, подељен на две групе (*M. aureus* и *M. calidus* sp. n. чине једну групу). Исти резултати добијени су и за K80 модел, за вредности дистанце 0,0017 - 0,0077. *M. unicolor* комплекс је подељен у две групе (*M. unicolor*, *M. albidus* sp. n.) на основу сва три типа генетичких дистанци. На Слици 5 приказани су резултати ABGD анализе применом матрица p дистанци и T92+G.



Слика 5. Утврђивање присуства баркод празнине (енг. *barcoding gap*) применом задатог опсега вредности дистанци унутар групе. А) *M. aureus* комплекс, некоригована *p* дистанца; Б) *Merodon aureus* комплекс, T92+G; В) *M. unicolor* комплекс, некоригована *p* дистанца; Г) *M. unicolor* комплекс, T92. / Figure 5. Determination of barcoding gap presence by applying a given range of distance values within a group. А) *M. aureus* complex, uncorrected *p* distance; Б) *Merodon aureus* complex, T92+G; В) *M. unicolor* complex, uncorrected *p* distance; Г) *M. unicolor* complex, T92.

Од укупно 1400 позиција анализираних COI секвенци 96 су варијабилне, а од тог броја 62 позиције су парсимонија информативне. Укупан број хаплотипова је 56, од чега 7 припада врстама *M. unicolor* комплекса и 49 врстама *M. aureus* комплекса (Таб. 5 и 6). Диверзитет хаплотипова (Hd) подгрупе износи 0,95769, просечан број нуклеотидних разлика (K) је 12,06887, а диверзитет нуклеотида (Pi) је 0,00862 (Таб. 5).

Мрежа COI хаплотипова *M. aureus* подгрупе конструисана је применом *Median-joining* методе. На мрежи је уочљиво груписање хаплотипова по групама које одговарају расподели секвенци у класе на филогенетским стаблима. *M. albidus* sp. n. и *M. calidus* sp. n. су међусобно најближе (8 мутационих корака). *M. unicolor* хаплотипска група је удаљена 15 мутационих корака од *M. albidus* sp. n.+*M. calidus* sp. n, док је *M. aureus* група удаљена 12 мутационих корака. *M. unicolor* и *M. aureus* су међусобно удаљене 11 мутационих корака. *M. ortus* sp. n. је издвојена са нешто већим бројем



мутационих корака у односу на поменуте хаплотипске групе (31 од *M. unicolor*, 26 од *M. aureus* и 32 од *M. albidus* sp. n.+*M. calidus* sp. n.) (Сл. 6).

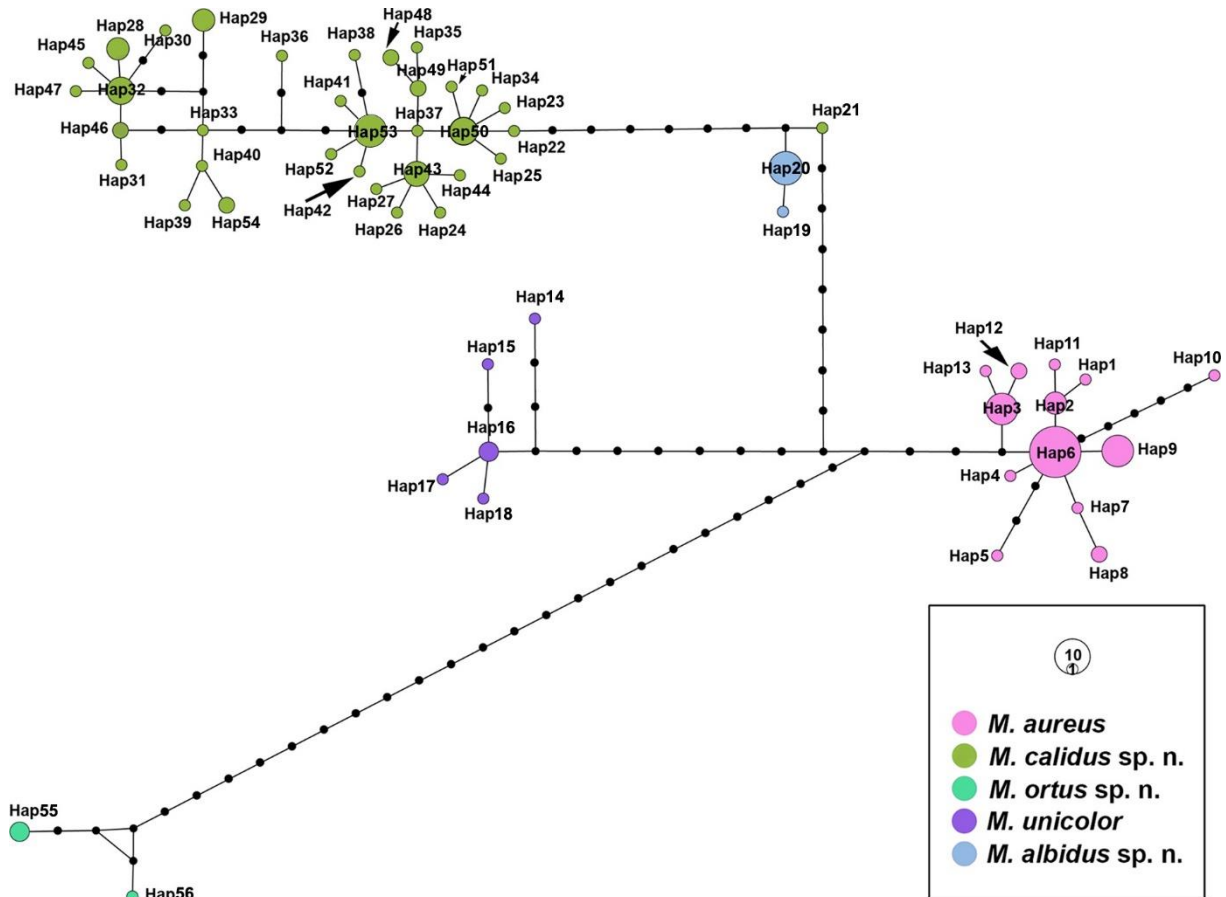
Табела 5. Параметри генетичког полиморфизма за *Merodon aureus* подгрупу. / Table 5. Parameters of genetic polymorphism of *Merodon aureus* subgroup.

	N	S	h	Hd	K	Pi
<i>M. aureus</i>	52	20	13	0,79336	1,91554	0,00137
<i>M. calidus</i> sp. n.	65	42	34	0,95962	5,19038	0,00371
<i>M. ortus</i> sp. n.	4	4	2	0,50000	2,00000	0,00143
<i>M. unicolor</i>	7	8	5	0,85714	2,28571	0,00163
<i>M. albidus</i> sp. n.	10	1	2	0,20000	0,20000	0,00014
подгрупа / subgroup	138	96	56	0,95769	12,06887	0,00862

N - број секвенци / number of sequences; S - број полиморфних позиција / number of polymorphic sites; h - број хаплотипова / number of haplotypes; Hd - диверзитет хаплотипова / haplotype diversity; K - просечан број нуклеотидних разлика / average number of nucleotide differences; Pi - диверзитет нуклеотида / nucleotide diversity.

Табела 6. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена за *Merodon aureus* подгрупу. / Table 6. List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of *Merodon aureus* subgroup.

COI хаплотипови [ДНК кодови] / COI haplotypes [DNA codes]	
<i>M. aureus</i>	Hap1 [AU162], Hap2 [AU163 AU708 AU842 AU845], Hap3 [AU164 AU706 AU707 AU838 AU839 AU840 AU841 AU843], Hap4 [AU375], Hap5 [AU374], Hap6 [AU169 AU170 AU660 AU662 AU663 AU664 AU665 AU666 AU667 AU668 AU669 AU670 AU671 AU695 AU696 AU697 AU698 AU699 AU700 AU710 AU832], Hap7 [MS91], Hap8 [MS90 MS92], Hap9 [AU828 AU830 AU831 AU833 AU834 AU835 AU836 AU837], Hap10 [AU709], Hap11 [AU844], Hap12 [AU372 AU373], Hap13 [AU371]
<i>M. calidus</i> sp. n.	Hap21 [AU713], Hap22 [AU703], Hap23 [AU702], Hap24 [AU711], Hap25 [AU365], Hap26 [AU715], Hap27 [AU718], Hap28 [AU719 AU847 AU849 AU857], Hap29 [AU720 AU851 AU852 AU854], Hap30 [AU721], Hap31 [AU722], Hap32 [AU723 AU853 AU855 AU856 AU858 AU860], Hap33 [AU724], Hap34 [AU726], Hap35 [AU728], Hap36 [AU729], Hap37 [AU730], Hap38 [AU731], Hap39 [AU732], Hap40 [AU733], Hap41 [AU814], Hap42 [AU816], Hap43 [AU165 AU712 AU714 AU716 AU717], Hap44 [AU166], Hap45 [AU846], Hap46 [AU848 AU850], Hap47 [AU859], Hap48 [AU171 AU725], Hap49 [AU172 AU174], Hap50 [AU363 AU366 AU367 AU701 AU704 AU705], Hap51 [AU364], Hap52 [AU369], Hap53 [AU370 AU817 AU818 AU819 AU820 AU821 AU822 AU823], Hap54 [AU173 AU727],
<i>M. ortus</i> sp. n.	Hap55 [AU485 AU487 AU488], Hap56 [AU486]
<i>M. unicolor</i>	Hap14 [AU317], Hap15 [AU322], Hap16 [AU319 AU320 AU323], Hap17 [AU321], Hap18 [AU318]
<i>M. albidus</i> sp. n.	Hap19 [AU796], Hap20 [AU794 AU795 AU797 AU798 AU799 AU800 AU801 AU802 AU803]



Слика 6. Median-joining мрежа COI хаплотипова *Merodon aureus* подгрупе. / Figure 6. Median-joining network of COI haplotypes of *Merodon aureus* subgenus.



У анализи молекуларне варијансе (АМОВА) додатно је тестирана генетичка структурираност која је показана у филогенетским анализама и конструкцијом мреже хаплотипова. Вредност индекса фиксације F_{ST} је 0.80174. Поређењем парова врста добијене су F_{ST} вредности у опсегу од 0,65152 (*M. albidus* sp. n. и *M. calidus* sp. n.) до 0,98118 (*M. albidus* sp. n. и *M. ortus* sp. n.). Све вредности F_{ST} су статистички значајне (ниво значајности $p \leq 0,05$) (Таб. 7).

Табела 7. Вредности индекса фиксације (F_{ST}) између парова врста *Merodon aureus* подгрупе. / Table 7. The values of fixation index between species pairs within *Merodon aureus* subgroup.

	1.	2.	3.	4.	5.
1. <i>M. aureus</i>		*	*	*	*
2. <i>M. calidus</i> sp. n.	0,76502		*	*	*
3. <i>M. ortus</i> sp. n.	0,93332	0,84830		*	*
4. <i>M. unicolor</i>	0,86162	0,75691	0,92645		*
5. <i>M. albidus</i> sp. n.	0,89793	0,65152	0,98118	0,94497	

*ниво значајности $p \leq 0,05$ / significance level: $p \leq 0,05$

Анализа 28S рРНК гена за *M. aureus* подгрупу укључивала је 127 секвенци. Дужина секвенци креће се од 584 - 588 bp, док је дужина поравнатих секвенци 588 bp.

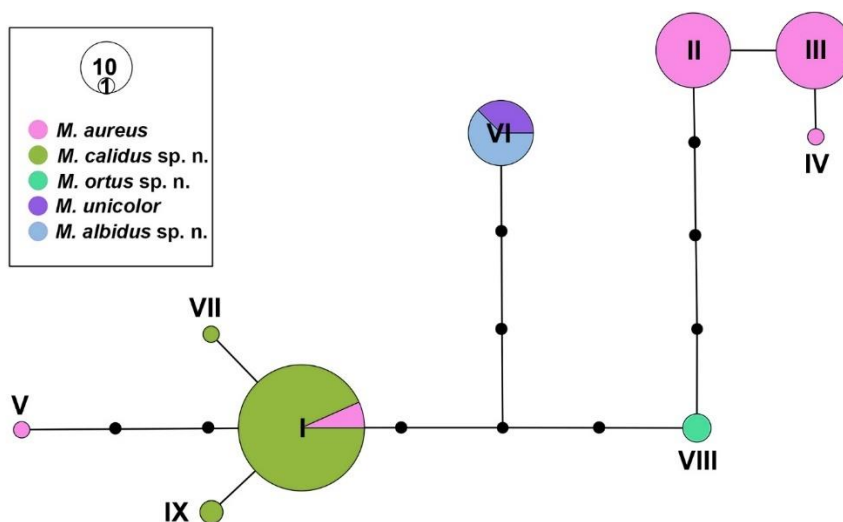
Укупно 5 позиција у сету поравнатих секвенци су празне позиције (енг. *gap*).

Укупан број варијабилних позиција је 11, од чега је 7 парсимонија информативних. Дефинисано је 9 генотипова (Сл. 7, Таб. 8), а диверзитет генотипова (Gd) је 0,7082. Диверзитет нуклеотида (Pi) је 0,00428. На основу *Median-joining* мрежа 28S генотипова показана су одређена одступања у односу на групе дефинисане анализама COI гена. *M. aureus* садржи генотипове од I до V, *M. calidus* sp. n. I, VII и IX, *M. ortus* sp. n. VIII, *M. unicolor* и *M. albidus* sp. n. деле генотип VI (Сл. 7).



Табела 8. Преглед генотипова 28S рРНК гена за *Merodon aureus* подгрупе. / Table 8. List of 28S rRNA genotypes of *Merodon aureus* subgroup.

28S генотипови / 28S genotypes	ДНК кодови / DNA codes	
IX	AU849 AU850	
VII	AU363	
I	AU701 AU703 AU704 AU713 AU714 AU715 AU717 AU718 AU721 AU726 AU727 AU729 AU730 AU733 AU165 AU166 AU171 AU172 AU173 AU174 AU364 AU365 AU366 AU367 AU369 AU370 AU712 AU719 AU720 AU722 AU728 AU731 AU732 AU814 AU816 AU817 AU818 AU821 AU846 AU847 AU848 AU851 AU852 AU853 AU855 AU856 AU857 AU858 AU859 AU860	
	AU695 AU696 AU697 AU699	
II	AU698 AU164 AU373 AU375 AU660 AU661 AU662 AU663 AU664 AU665 AU666 AU668 AU669 AU670 AU671 AU828 AU829 AU830 AU831 AU832 AU835 AU836 AU837	
III	AU700 AU706 AU707 AU708 AU162 AU163 AU170 AU371 AU372 AU374 AU376 AU709 AU833 AU834 AU838 AU839 AU840 AU841 AU842 AU843 AU844 AU845	
IV	AU710	
V	AU169	
VI	AU318 AU319 AU320 AU321 AU322 AU323 AU794 AU795 AU796 AU797 AU798 AU799 AU800 AU801 AU802 AU803	
VIII	AU485 AU486 AU488	



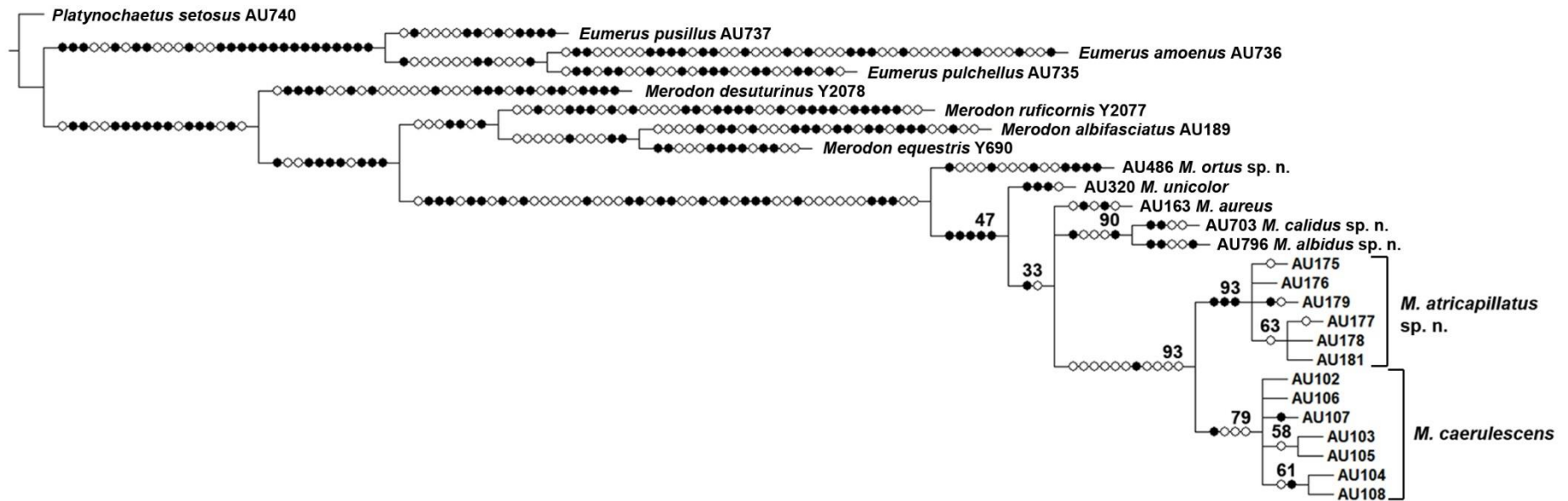
Слика 7. Median-joining мрежа 28S генотипова *Merodon aureus* подгрупе. / Figure 7. Median-joining network of 28S genotypes of *Merodon aureus* subgroup.



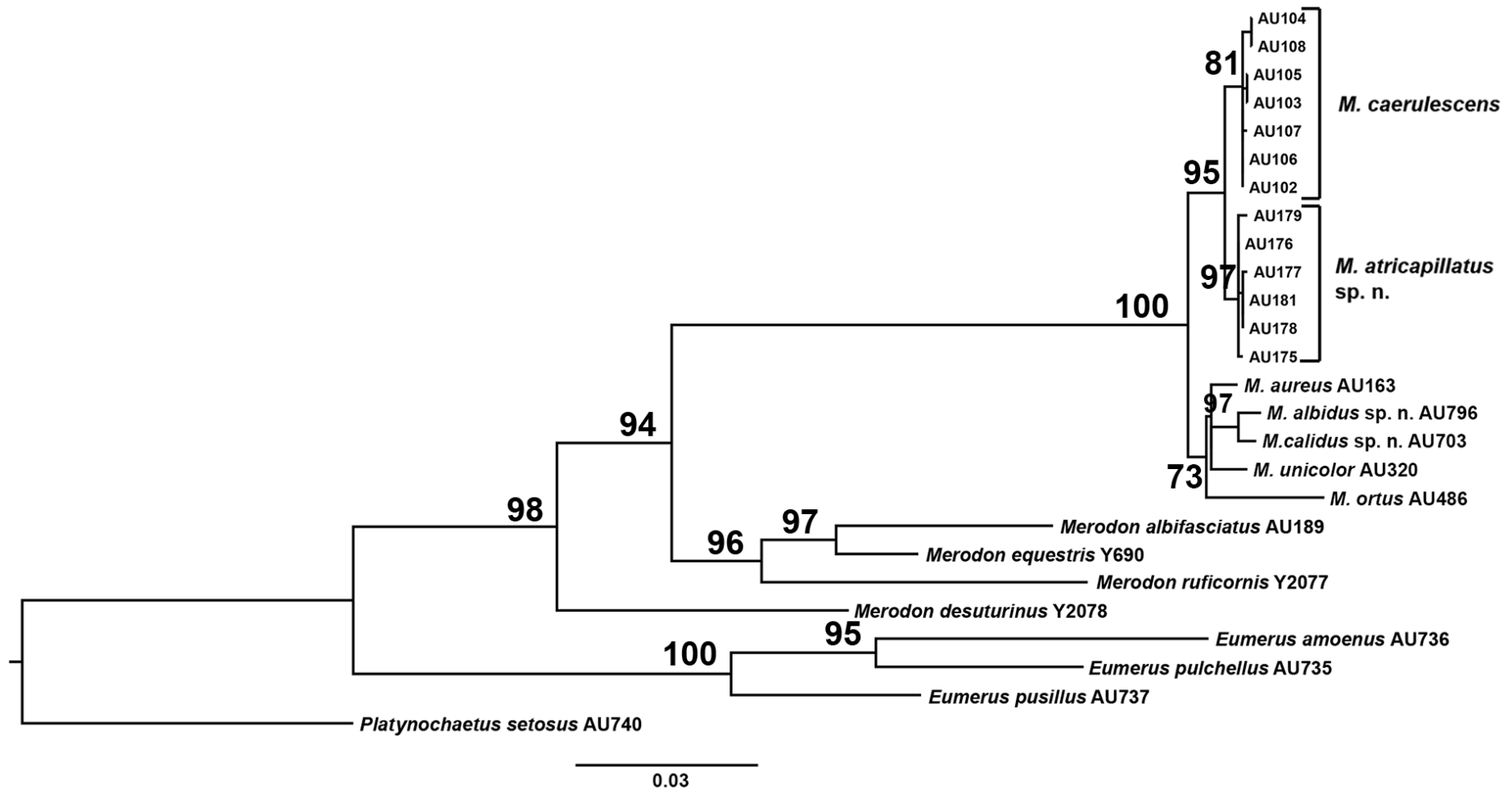
6.2. *Merodon caerulescens* комплекс

Анализиран је сет 13 комбинованих секвенци 3' и 5' краја COI гена. Дужина поравнатих секвенци износи 1400 bp. У анализу су укључене и по једна секвенца за сваку врсту *M. aureus* подгрупе.

Методом максималне парсимоније добијена су 2 стабала једнаке парсимоније. Дужина стабала је 668 корака (CI=64, RI=73), док је консензус (*Strict consensus*) стабло дужине 669 корака (CI=64, RI=72) (Сл. 8). Консензус и ML стабло имају идентичну топологију. На оба стабла *M. caerulescens* и *M. atricapillatus* sp. n. се издвајају у засебне кладе са значајном подршком (81/79 и 97/ 93) (Сл. 8 и 9). Анализиране јединке *M. caerulescens* припадају популацији са острва Родос, а *M. atricapillatus* sp. n. популацији са острва Крит. Топологија NJ стабла се разликује у односу на стабло парсимоније и ML стабло пре свега по положају кладе која обухвата представнике *M. aureus* подгрупе (Сл. П2 у Прилогу2).



Слика 8. *Strict consensus* COI стабло од 2 једнака стабала добијених анализом парсимоније за *Merodon caerulescens* комплекс. Дужина: 669 корака, *Consistency index* (CI) 64, *Retention index* (RI) 73. *Bootstrap* вредности ≥ 50 приказане су поред чворова. Испуњени кругови представљају карактере који нису хомоплазије, празни кругови представљају хомоплазије. / *Figure 8. Strict consensus COI tree of 2 equally parsimonious trees of Merodon caerulescens complex. Length: 669 steps, Consistency index (CI) 64, Retention index (RI) 73. The bootstrap values ≥ 50 are indicated near nodes. Filled circles represent non-homoplasious characters, open circles are homoplasious characters.*

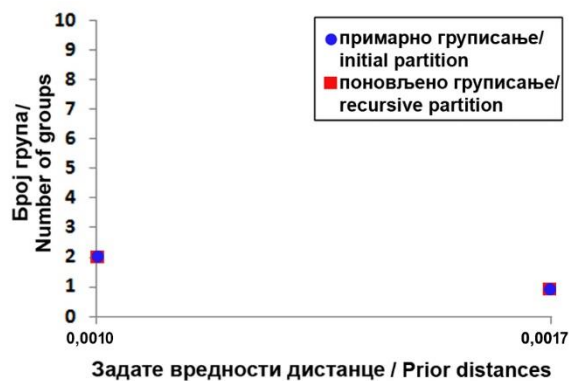


Слика 9. Maximum-likelihood COI стабло за *Merodon caerulescens* комплекс. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / Figure 9. Maximum-likelihood COI tree of *Merodon caerulescens* complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.



Некоригована просечна вредност дистанце p између врста и/или потенцијалних врста *M. caerulescens* комплекса (*M. caerulescens* и *M. atricapillatus* sp. n.) је 0,7%.

Применом АВГД софтвера извршено је груписање *M. caerulescens* комплекса на две групе које одговарају *M. caerulescens* и *M. atricapillatus* sp. n. (вредност дистанце 0,001) (Сл. 10). Исти резултати добијени су анализом сва три типа дистанци (p дистанца, Т92 и К80).



Слика 10. Присуство баркод празнине (енг. *barcoding gap*) унутар *Merodon caerulescens* комплекса. / *Figure 10. The presence of the barcoding gap within Merodon caerulescens complex.*

Од укупно 1400 позиција анализираних СОИ секвенци 16 су варијабилне, док су 11 позиција парсимонија информативне. Укупан број хаплотипова је 9 (Таб. 9 и 10). Диверзитет хаплотипова (H_d) комплекса износи 0,949, просечан број нуклеотидних разлика (K) је 5,769, а диверзитет нуклеотида (P_i) је 0,00412 (Таб 9).

Табела 9. Параметри генетичког полиморфизма за *Merodon caerulescens* комплекс. / *Table 9. Parameters of genetic polymorphism of Merodon caerulescens complex.*

	N	S	h	H_d	K	P_i
<i>M. caerulescens</i>	7	4	4	0,85714	1,71429	0,00122
<i>M. atricapillatus</i> sp. n.	6	5	5	0,93333	1,93333	0,00138
комплекс / complex	13	16	9	0,94872	5,76923	0,00412

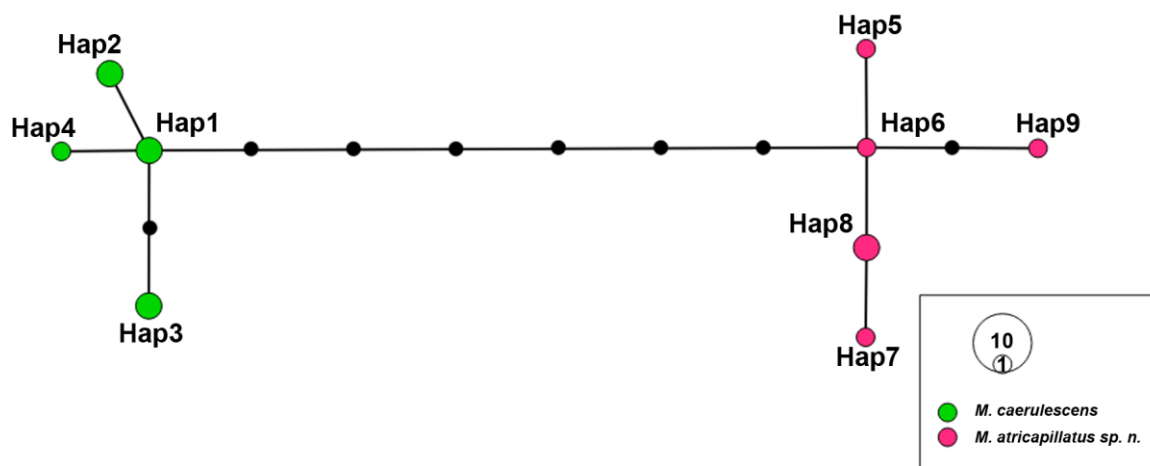
N - број секвенци / *number of sequences*; S - број полиморфних позиција / *number of polymorphic sites*; h - број хаплотипова / *number of haplotypes*; H_d - диверзитет хаплотипова / *haplotype diversity*; K - просечан број нуклеотидних разлика / *average number of nucleotide differences*; P_i - диверзитет нуклеотида / *nucleotide diversity*.



Median-joining мрежа COI хаплотипова *M. caerulescens* комплекса показује јасно груписање хаплотипова у 2 групе. Хаплотипови Hap1 - Hap4 припадају *M. caerulescens*, Hap5 - Hap9 припада *M. atricapillatus* sp. n. (Таб. 10). Хаплотипске групе су међусобно удаљене 7 мутационих корака (Сл. 11).

Табела 10. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена за *Merodon caerulescens* комплекс. / Table 10. List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of *Merodon caerulescens* complex.

COI хаплотипови [ДНК кодови] / COI haplotypes [DNA codes]	
<i>M. caerulescens</i>	Hap1 [AU102 AU106], Hap2 [AU103 AU105], Hap3 [AU104 AU108], Hap4 [AU107]
<i>M. atricapillatus</i> sp. n.	Hap5 [AU175], Hap6 [AU176], Hap7 [AU177], Hap8 [AU178 AU181], Hap9 [AU179]



Слика 11. *Median-joining* мрежа COI хаплотипова *Merodon caerulescens* комплекса. / Figure 11. *Median-joining* network of COI haplotypes of *Merodon caerulescens* complex.

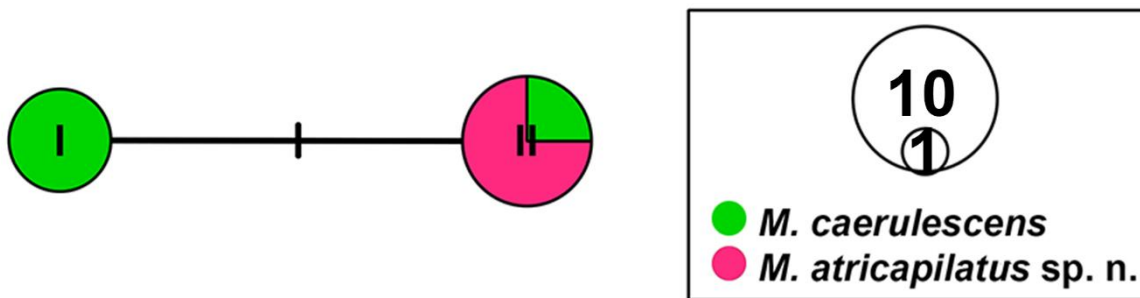
Анализа молекуларне варијансе (AMOVA) потврђује генетичку дивергенцију показану у филогентским анализама и конструкцијом мреже хаплотипова. Вредност индекса фиксације за *M. caerulescens* комплекс је $\Phi_{ST}=0,80197$.

Укупно је анализирано 13 секвенци 28S рРНК гена за *M. caerulescens* комплекс. Дужина поравнатих секвенци је 585 бп. Присутна је једна варијабилна и за парсимонију информативна позиција која дефинише 2 различита генотипа ($Gd=0,5128$). Генотип I је јединствен за *M. caerulescens*, док генотип II деле *M. caerulescens* и *M. atricapillatus* sp. n. (Таб. 11, Сл. 12).



Табела 11. Преглед генотипова 28S рДНК за *Merodon caerulescens* комплекс. / Table 11. List of combined 28S genotypes of *Merodon caerulescens* complex.

28S генотипови / 28S genotypes	ДНК кодови / DNA codes	
I	AU102 AU103 AU105 AU106 AU108	<i>M. caerulescens</i>
	AU104 AU107	
II	AU175 AU176 AU177 AU178 AU179 AU181	<i>M. atricapillatus</i> sp. n.



Слика 12. Median-joining мрежа 28S генотипова *Merodon aureus* подгрупе. / Figure 12. Median-joining network of 28S genotypes of *Merodon aureus* subgroup.



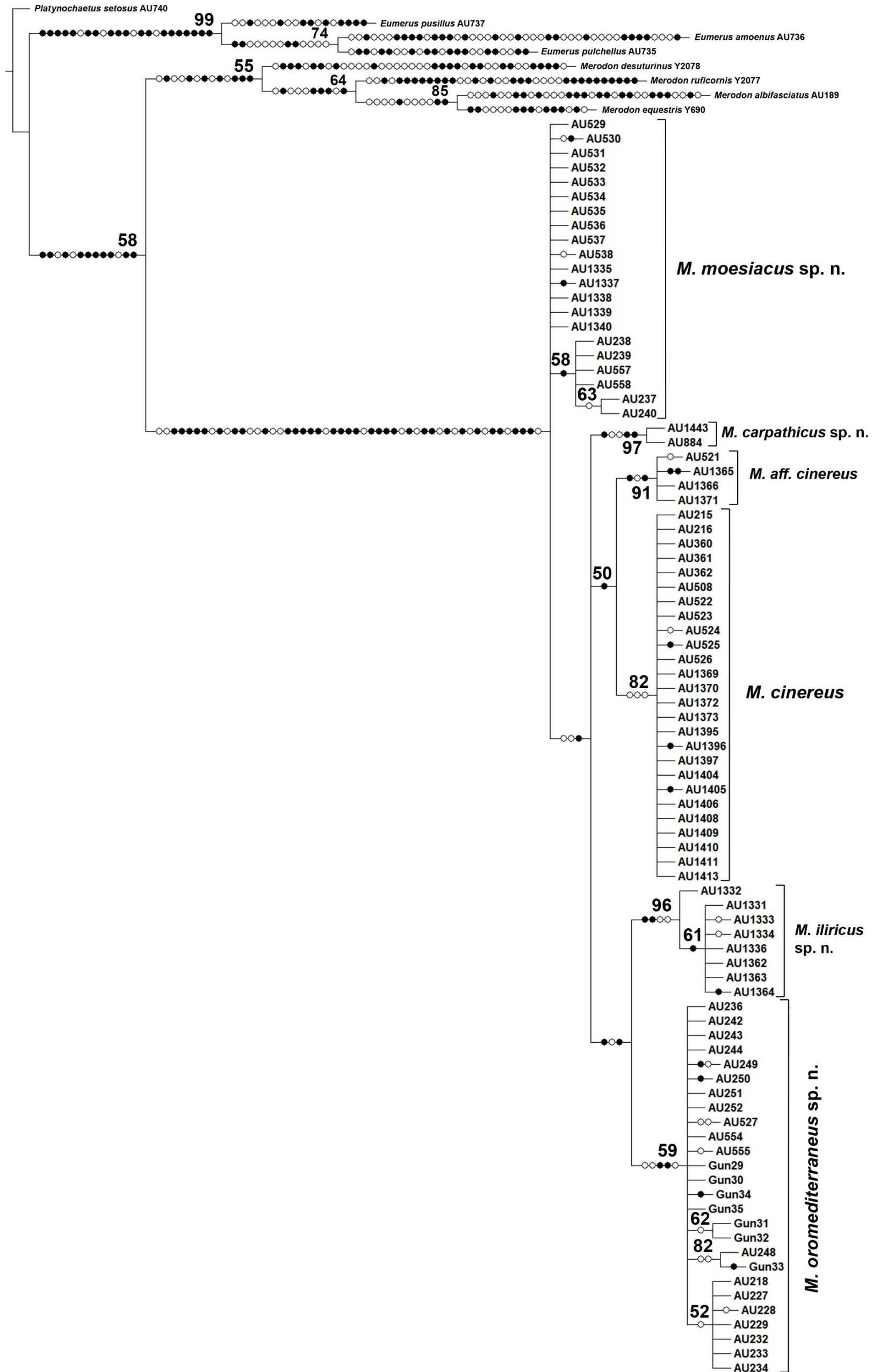
6.3. *Merodon cinereus* подгрупа

6.3.1. *Merodon cinereus* комплекс

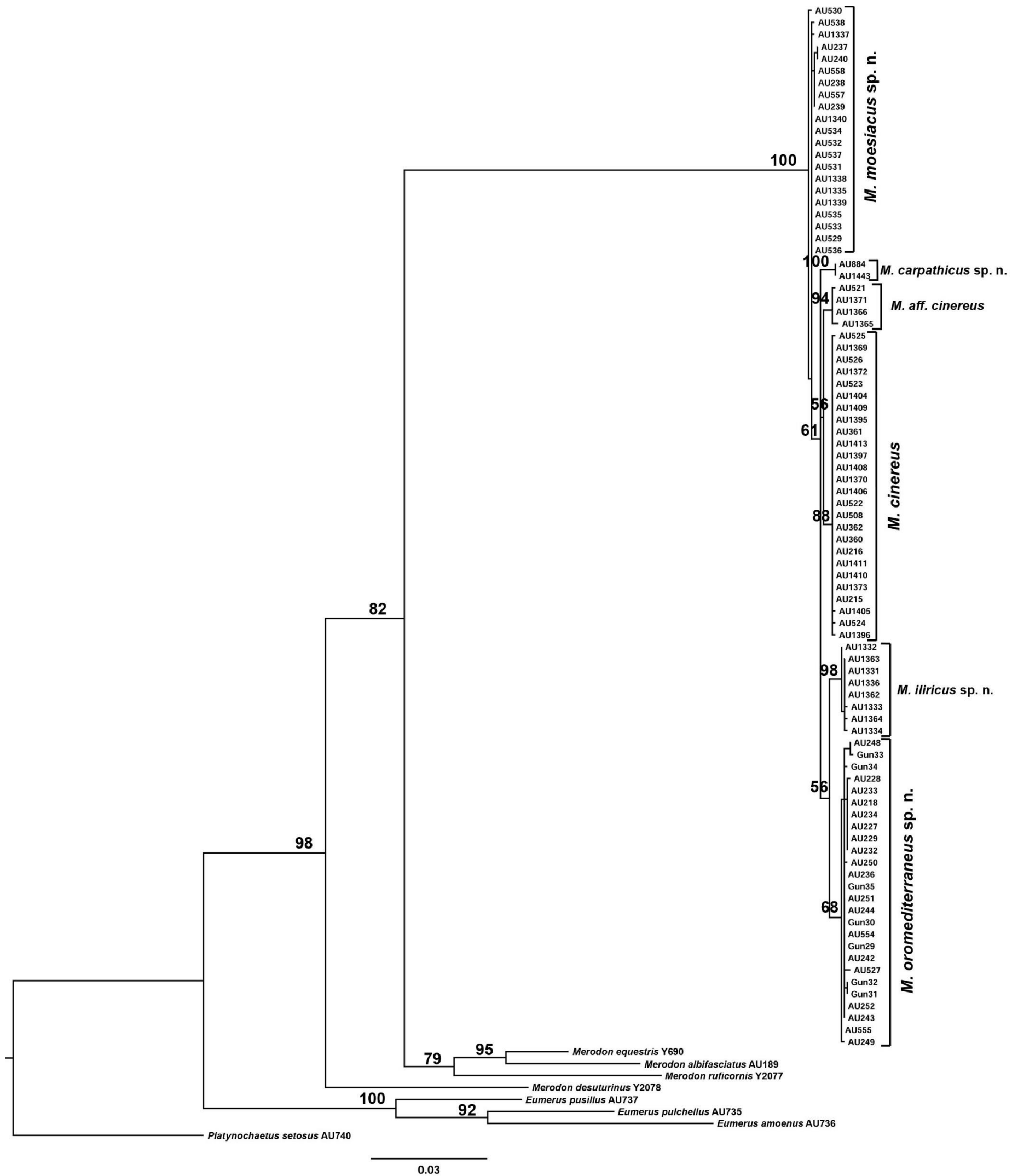
За конструисање филогенетских стабала *M. cinereus* комплекса анализирани су комбиноване секвенце 3' и 5' краја COI гена. Анализирани сет укључује 87 секвенци. Дужина поравнатих секвенци износи 1321 bp. Методом максималне парсимоније добијено је 12 стабала једнаке парсимоније (енг. *equally parsimonious*). Дужина стабала је 627 корака (CI=66, RI=82). Консензус (*Strict consensus*) стабло је дужине 630 корака (CI=65, RI=82) (Сл. 13). Додатно, конструисана су и ML и NJ филогенетска стабла. Консензус и ML стабло имају идентичну топологију *M. toesiacus* sp. n.+((*M. carpathicus* sp. n.)+((*M. cinereus*)+(*M. aff. cinereus*))+((*M. oromediterraneus* sp. n.)+(*M. iliricus* sp. n.))) (Сл. 13 и 14), док се NJ незнатно разликује (Сл. П3 у Прилогу 2). Конструисана стабла поседују извесне разлике у вредностима *bootstrap* подршке за поједине кладе. На основу топологије стабала може се уочити један велики ²кластер умутнут у *M. toesiacus* sp. n. кладу. Кластер се састоји из 5 монофилетских клада: *M. carpathicus* sp. n., *M. cinereus* и *M. aff. cinereus*, *M. oromediterraneus* sp. n. и *M. iliricus* sp. n. Вредност *bootstrap* подршке за кладе, на сва три стабла је изнад 80 изузев за *M. oromediterraneus* sp. n. (59/68/59) и *M. cinereus* на NJ стаблу (64). *M. toesiacus* sp. n. обухвата популације са Старе планине, Копаоника и Голије (Србија), *M. carpathicus* sp. n. представљена је са две јединке са Карпата (Румунија), *M. cinereus* и *M. aff. cinereus* обухватају јединке са Алпа (Аустрија), *M. oromediterraneus* sp. n. обухвата популације са Велебита (Хрватска), Проклетија (Црна Гора), Кожуфа (Македонија) и Родопа (Бугарска), док *M. iliricus* sp. n. обухвата популацију са Златара (Србија) (Сл П2, у Прилогу 3).

Некориговане просечне вредности дистанци (*p* - *uncorrected pairwise distance*) између парова врста *M. cinereus* комплекса кретале су се од 0,5% између *M. cinereus* и *M. aff. cinereus* до 1% између *M. carpathicus* sp. n. и *M. iliricus* sp. n., *M. carpathicus* sp. n. и *M. oromediterraneus* sp. n., *M. aff. cinereus* и *M. iliricus* sp. n., *M. cinereus* и *M. oromediterraneus* sp. n. (Таб. 12).

² Термин „кластер” се у опису филогенетских стабала користи за дефинисање монофилетске кладе коју чине две или више по хијерархији нижих клада.



Слика 13. *Strict consensus* COI стабло од 12 једнаких стабала добијених анализом парсимоније за *Merodon cinereus* комплекс. Дужина: 630 корака, *Consistency index* (CI) 65, *Retention index* (RI) 82. *Bootstrap* вредности ≥ 50 приказане су поред чворова. Испуњени кругови представљају карактере који нису хомоплазије, празни кругови представљају хомоплазије. / *Figure 13. Strict consensus COI tree of 12 equally parsimonious trees of Merodon cinereus complex. Length: 630 steps, Consistency index (CI) 65, Retention index (RI) 82. The bootstrap values ≥ 50 are indicated near nodes. Filled circles represent non-homoplasious characters, open circles are homoplasious characters.*



Слика 14. Maximum-likelihood COI стабло за *Merodon cinereus* комплекс. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / Figure 14. Maximum-likelihood COI tree of *Merodon cinereus* complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.

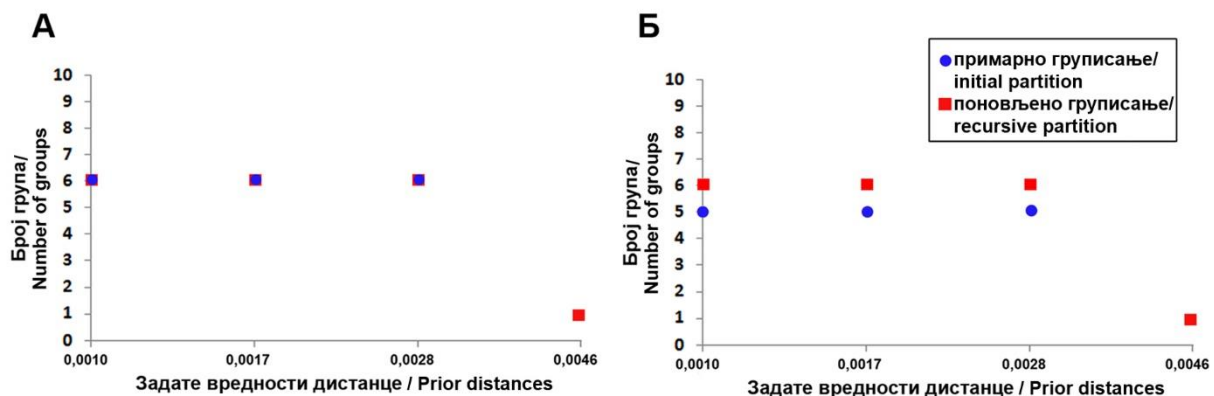


Табела 12. Некориговане просечне вредности дистанци (p - *uncorrected pairwise distance*) између парова врста и/или потенцијалних врста *Merodon cinereus* комплекса. / *Table 12. Uncorrected pairwise distances between species and/or putative species pairs within Merodon cinereus complex.*

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1. <i>M. moesiacus</i> sp. n.		0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
2. <i>M. carpathicus</i> sp. n.	0,006		0,002	0,002	0,002	0,003
3. <i>M. aff. cinereus</i>	0,006	0,007		0,002	0,003	0,003
4. <i>M. cinereus</i>	0,006	0,007	0,005		0,003	0,003
5. <i>M. iliricus</i> sp. n.	0,009	0,01	0,01	0,009		0,002
6. <i>M. oromediterraneus</i> sp. n.	0,008	0,01	0,009	0,01	0,008	

p дистанца - испод дијагонале; стандардно одступање - изнад дијагонале. / *p distance - below diagonal; standard deviation - above diagonal.*

Применом софтвера ABGD (Puillandre и сар., 2012) секвенце су подељене у групе, хипотетичке врсте, на основу присуства баркод празнине између дистанци унутар група и између група. Анализа је урађена у три понављања на основу p дистанци, дистанци израчунатих на основу T92 модела и K80 модела. Добијени резултати су слични за сва три типа дистанци (идентични за T92 и K80). На основу вредности дистанци у опсегу 0,0010 - 0,0028 извршено је груписање на 6 група. Добијене групе одговарају *M. moesiacus* sp. n., *M. carpathicus* sp. n., *M. cinereus*, *M. aff. cinereus*, *M. oromediterraneus* sp. n. и *M. iliricus* sp. n. (Сл. 15).



Слика 15. Утврђивање присуства баркод празнине (енг. *barcoding gap*) *Merodon cinereus* комплекса применом задатог опсега вредности дистанци унутар групе. А) некоригована p дистанца; Б) T92. / *Figure 15. Determination of barcoding gap presence within Merodon cinereus complex by applying a given range of distance values within a group. A) uncorrected p distance; B) T92.*



Од укупно 1321 позиције анализираних COI секвенци 49 су биле варијабилне, док су 32 позиције парсимонија информативне. Укупан број хаплотипова је 31 (Таб. 13 и 14). Диверзитет хаплотипова (Hd) комплекса износи 0,900, просечан број нуклеотидних разлика (K) је 8,260, а диверзитет нуклеотида (Pi) је 0,00625 (Таб. 13).

Табела 13. Параметри генетичког полиморфизма за *Merodon cinereus* комплекс. / Table 13. Parameters of genetic polymorphism of *Merodon cinereus* complex.

	N	S	h	Hd	K	Pi
<i>M. moesiacus</i> sp. n.	21	6	6	0,65238	0,99048	0,00075
<i>M. carpathicus</i> sp. n.	2	0	1	0,00000	0,00000	0,00000
<i>M. aff. cinereus</i>	4	3	3	0,83333	1,50000	0,00114
<i>M. cinereus</i>	27	17	6	0,34188	1,25926	0,00095
<i>M. iliricus</i> sp. n.	8	4	5	0,78571	1,00000	0,00076
<i>M. oromediterraneus</i> sp. n.	25	12	11	0,81333	1,55333	0,00118
комплекс / complex	87	49	31	0,90029	8,25982	0,00625

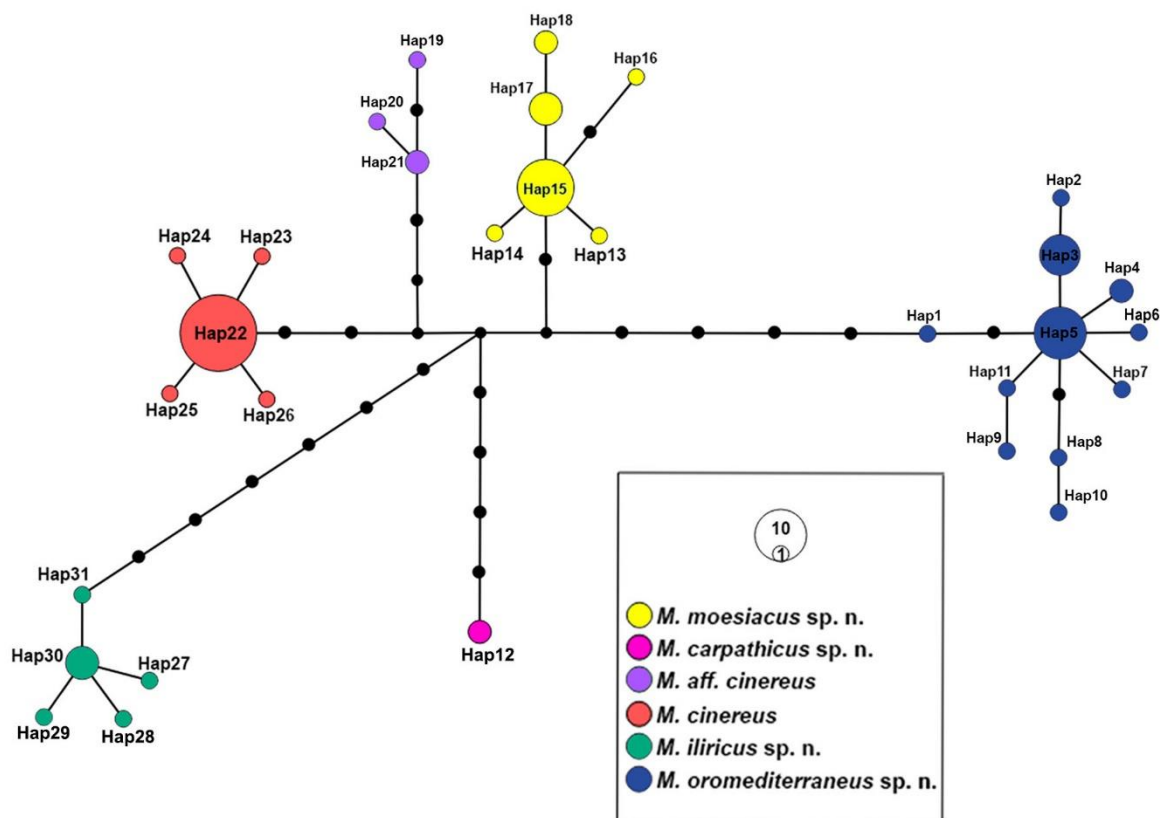
N - број секвенци / number of sequences; S - број полиморфних позиција / number of polymorphic sites; h - број хаплотипова / number of haplotypes; Hd - диверзитет хаплотипова / haplotype diversity; K - просечан број нуклеотидних разлика / average number of nucleotide differences; Pi - диверзитет нуклеотида / nucleotide diversity.

Median-joining мрежа COI хаплотипова *M. cinereus* комплекса показује јасно груписање хаплотипова у 6 група. Хаплотипови Нар1 - Нар11 припадају *M. oromediterraneus* sp. n., Нар12 припада *M. carpathicus* sp. n., *M. moesiacus* sp. n. укључује Нар13 - Нар18, *M. aff. cinereus* обухвата хаплотипове Нар19 - Нар21, *M. cinereus* Нар22 - Нар26, док *M. iliricus* sp. n. укључује Нар27 - Нар31 (Таб. 13). Хаплотипске групе *M. iliricus* sp. n. и *M. oromediterraneus* sp. n. су међусобно најудаљеније (13 мутационих корака), док су *M. cinereus* и *M. aff. cinereus* најближе (6 мутационих корака) (Сл. 16).



Табела 14. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена за *Merodon cinereus* комплекс. / Table 14. List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of *Merodon cinereus* complex.

COI хаплотипови [ДНК кодови] / COI haplotypes [DNA codes]	
<i>M. moesiacus</i> sp. n.	Hap13 [AU1337], Hap14 [AU538], Hap15 [AU529 AU531 AU532 AU533 AU534 AU535 AU536 AU537 AU1335 AU1338 AU1339 AU1340], Hap16 [AU530], Hap17 [AU238 AU239 AU557 AU558], Hap18 [AU237 AU240]
<i>M. carpathicus</i> sp. n.	Hap12 [AU1443 AU884]
<i>M. aff. cinereus</i>	Hap19 [AU1365], Hap20 [AU521], Hap21 [AU1366 AU1371]
<i>M. cinereus</i>	Hap22 [AU215 AU216 AU360 AU361 AU362 AU508 AU522 AU523 AU526 AU1369 AU1370 AU1372 AU1373 AU1395 AU1397 AU1404 AU1406 AU1408 AU1409 AU1410 AU1411 AU1413], Hap23 [AU524], Hap24 [AU525], Hap25 [AU1396], Hap26 [AU1405]
<i>M. iliricus</i> sp. n.	Hap27 [AU1364], Hap28 [AU1334], Hap29 [AU1333], Hap30 [AU1331 AU1336 AU1362 AU1363], Hap31 [AU1332],
<i>M. oromediterraneus</i> sp. n.	Hap1 [AU527], Hap2 [AU228], Hap3 [AU218 AU227 AU229 AU232 AU233 AU234], Hap4 [Gun31 Gun32], Hap5 [AU236 AU242 AU243 AU244 AU251 AU252 AU554 Gun29 Gun30 Gun35], Hap6 [Gun34], Hap7 [AU250], Hap8 [AU248], Hap9 [AU249], Hap10 [Gun33], Hap11 [AU555]



Слика 16. Median-joining мрежа COI хаплотипова *Merodon cinereus* комплекса. / Figure 16. Median-joining network of COI haplotypes of *Merodon cinereus* complex.

Анализа молекуларне варијансе (AMOVA) додатно потврђује генетичку структурираност која је показана у филогенетским анализама и конструкцијом мреже



хаплотипова. Вредност индекса фиксације за *M. cinereus* комплекс је $\Phi_{ST}=0,88048$. Поређењем парова врста добијене су Φ_{ST} вредности у опсегу од 0,81692 (*M. aff. cinereus* и *M. cinereus*) до 0,93353 (*M. carpathicus* sp. n. и *M. iliricus* sp. n.). Све вредности Φ_{ST} су статистички значајне (ниво значајности $p \leq 0,05$) (Таб. 15).

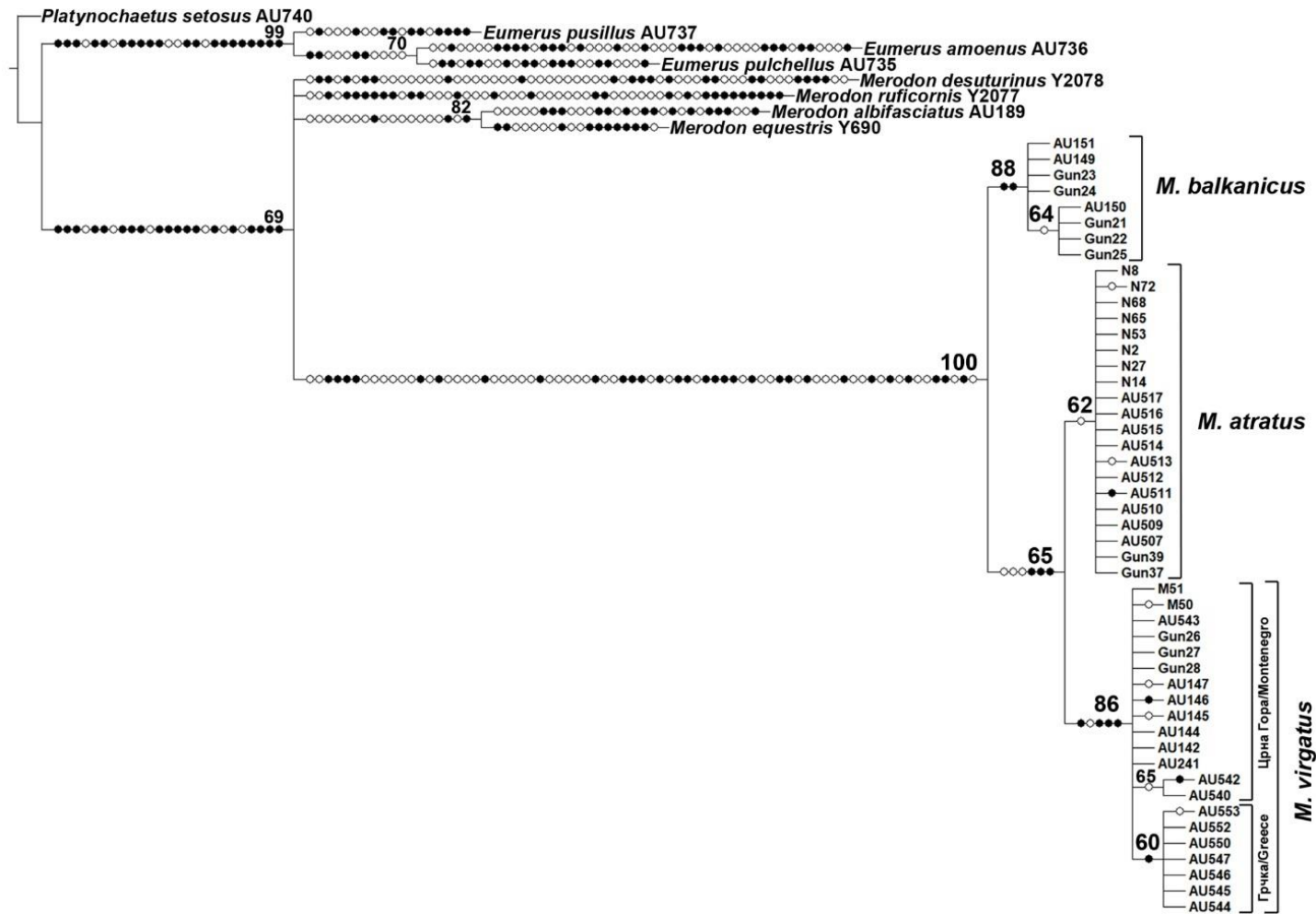
Табела 15. Вредности индекса фиксације (Φ_{ST}) између парова врста и/или потенцијалних врста *Merodon cinereus* комплекса. / Table 14. The values of fixation index between species and/or supposed species pairs within *Merodon cinereus* complex.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1. <i>M. moesiacus</i> sp. n.		*	*	*	*	*
2. <i>M. carpathicus</i> sp. n.	0,89262		*	*	*	*
3. <i>M. aff. cinereus</i>	0,87090	0,88626		*	*	*
4. <i>M. cinereus</i>	0,85441	0,87289	0,81692		*	*
5. <i>M. iliricus</i> sp. n.	0,91599	0,93353	0,91109	0,90300		*
6. <i>M. oromediterraneus</i> sp. n.	0,87372	0,89243	0,86288	0,88567	0,86988	

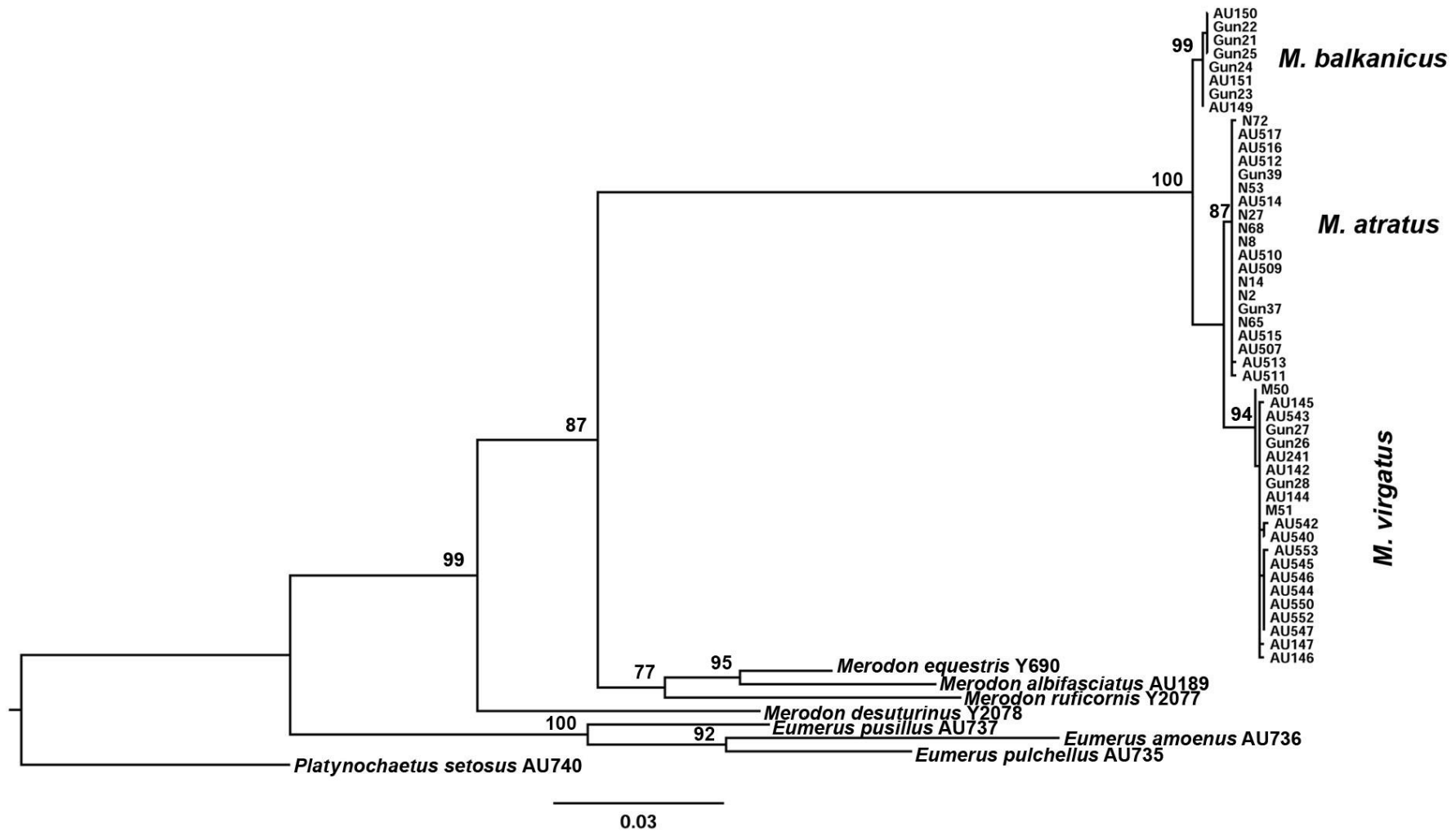
*ниво значајности: $p \leq 0,05$ / significance level: $p \leq 0,05$

6.3.2. *Merodon atratus* комплекс

Сет комбинованих секвенци 3' и 5' краја COI гена *M. atratus* комплекса укључује 49 секвенци дужине 1313 бр. Анализом максималне парсимоније добијено је 6 стабала једнаке парсимоније (596 корака, CI=66, RI=80). Консензус (*Strict consensus*) стабло је дужине 620 корака (CI=64, RI=78) (Сл. 17). Применом ML методе конструисано је филогенетско стабло идентичне топологије као MP конзесус стабло, (*M. balkanicus*)+((*M. atratus*)+(*M. virgatus*)) (Сл. 17 и 18). Вредности *bootstrap* подршке за кладе су ниже на MP стаблу (88, 62, 86) у односу на вредности на ML стаблу (99, 87, 94). Додатно, конструисано је и NJ стабло са нешто измењеном топологијом ((*M. atratus*)+(*M. virgatus*)) кластер је уметнут унутар *M. balkanicus*) (Сл. П4 у Прилогу 2). Вредности *bootstrap* подршке за *M. atratus* и *M. virgatus* на NJ стаблу су 81 и 96. *M. balkanicus* обухвата јединке са Старе планине (Србија), *M. atratus* обухвата јединке са Алпа (Аустрија) док *M. virgatus* обухвата јединке са планина Дурмитор, Проклетије (Црна Гора) и Олимп (Грчка) (Сл. П2 у Прилогу 3).



Слика 17. *Strict consensus* COI стабло од 6 једнаких стабала добијених анализом парсимоније за *Merodon atratus* комплекс. Дужина: 620 корака, *Consistency index* (CI) 64, *Retention index* (RI) 78. *Bootstrap* вредности ≥ 50 приказане су поред чворова. Испуњени кругови представљају карактере који нису хомоплазије, празни кругови представљају хомоплазије. / *Figure 17. Strict consensus COI tree of 6 equally parsimonious trees of Merodon atratus complex. Length: 620 steps, Consistency index (CI) 64, Retention index (RI) 78. The bootstrap values ≥ 50 are indicated near nodes. Filled circles represent non-homoplasious characters, open circles are homoplasious characters.*



Слика 18. *Maximum-likelihood* COI стабло за *Merodon atratus* комплекс. *Bootstrap* вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / *Figure 18. Maximum-likelihood COI tree of Merodon atratus complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.*



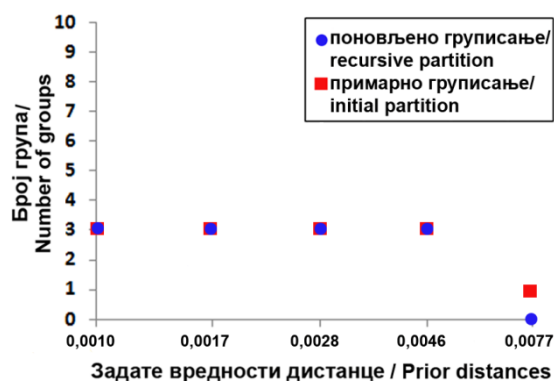
Израчунате p вредности дистанци између парова врста *M. atratus* комплекса кретале су се од 0,8% између *M. atratus* и *M. virgatus* до 1,4% између *M. virgatus* и *M. balkanicus* (Таб. 16).

Табела 16. Некориговане просечне вредности дистанци (p - *uncorrected pairwise distance*) између парова врста и/или потенцијалних врста *Merodon atratus* комплекса. / *Table 16. Uncorrected pairwise distances between species and/or supposed species pairs within Merodon atratus complex.*

	1.	2.	3.
1. <i>M. balkanicus</i>		0,003	0,003
2. <i>M. atratus</i>	0,009		0,002
3. <i>M. virgatus</i>	0,014	0,008	

p дистанца - испод дијагонале; стандардно одступање - изнад дијагонале. / p distance - below diagonal; standard deviation - above diagonal.

ABGD анализом некоригованих p дистанци, дистанци израчунатих на основу Т92 модела и К80 дистанци секвенце су подељене у групе, хипотетичке врсте, на основу присуства баркод празнине између дистанци унутар група и између група. Анализа је резултовала у подели на три групе за вредности дистанце од 0,0010 до 0,0046. Групе одговарају врстама *M. balkanicus*, *M. atratus* и *M. virgatus* (Сл. 19).



Слика 19. Присуство баркод шупљине (енг. *barcoding gap*) унутар *Merodon atratus* комплекса. / *Figure 19. The presence of the barcoding gap within Merodon atratus complex.*

Од укупно 1313 позиција анализираних COI секвенци 28 су варијабилне, док су 22 позиције парсимонија информативне. Укупан број хаплотипова је 15 (Таб. 17 и 18). Диверзитет хаплотипова комплекса износи $H_d=0,83759$, просечан број нуклеотидних разлика $K=8,20408$, а диверзитет нуклеотида $P_i=0,00625$ (Таб. 17).



Табела 17. Параметри генетичког полиморфизма за *Merodon atratus* комплекс. / Table 17. Parameters of genetic polymorphism of *Merodon atratus* complex.

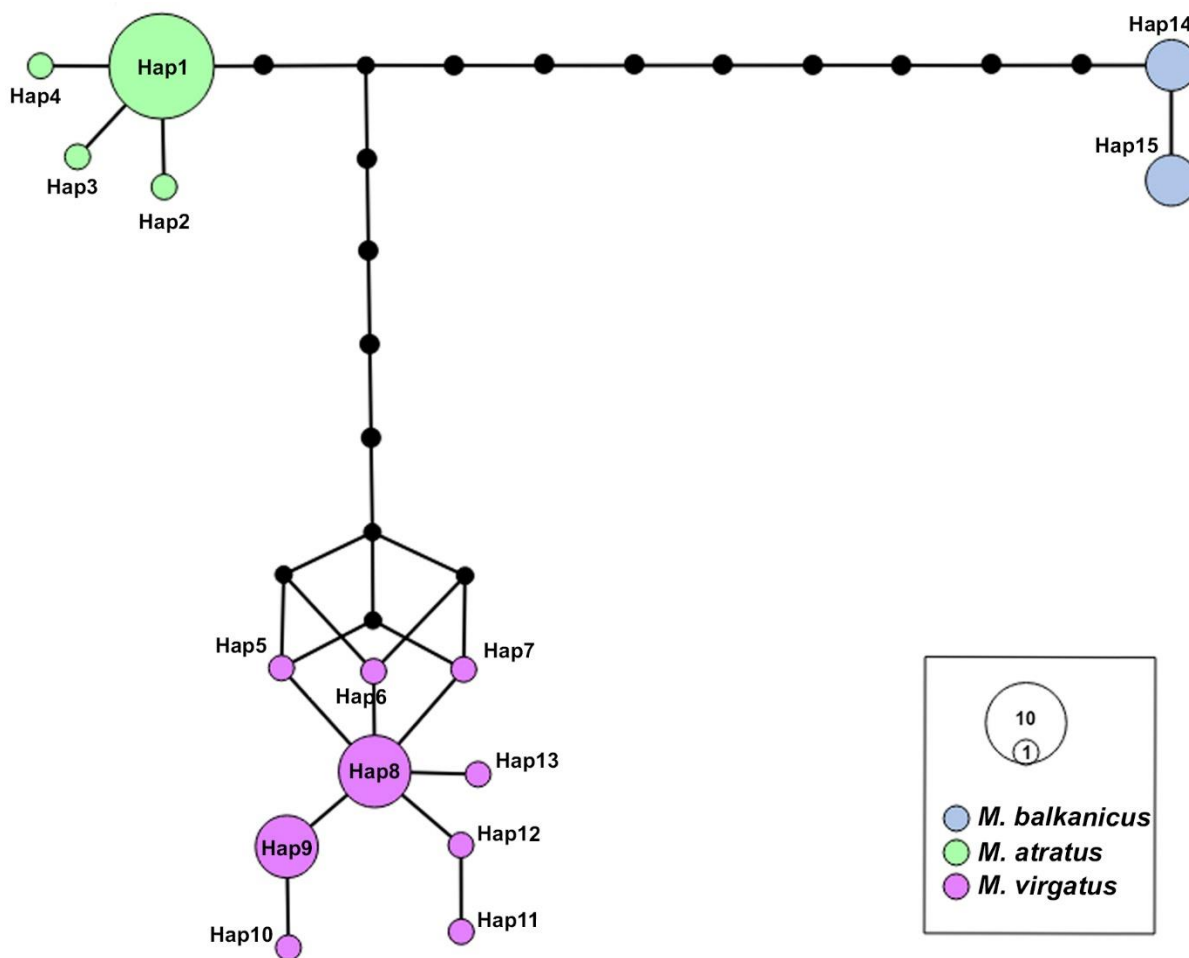
	N	S	h	Hd	K	Pi
<i>M. balkanicus</i>	8	1	2	0,57143	0,57143	0,00044
<i>M. atratus</i>	20	3	4	0,28421	0,30000	0,00023
<i>M. virgatus</i>	21	8	9	0,79524	1,21905	0,00093
комплекс / complex	49	28	15	0,83759	8,20408	0,00625

N - број секвенци / number of sequences; S - број полиморфних позиција / number of polymorphic sites; h - број хаплотипова / number of haplotypes; Hd - диверзитет хаплотипова / haplotype diversity; K - просечан број нуклеотидних разлика / average number of nucleotide differences; Pi - диверзитет нуклеотида / nucleotide diversity.

На *Median-joining* мрежи COI хаплотипови *M. balkanicus*, *M. atratus* и *M. virgatus* су груписани у јасно одвојене групе. *M. balkanicus* и *M. virgatus* су најудаљенији (14 мутационих корака), док су *M. atratus* и *M. virgatus* најближи (7 мутационих корака) (Сл. 20). *M. atratus* је од *M. balkanicus* удаљен 11 мутационих корака.

Табела 18. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена за *Merodon atratus* комплекс. / Table 18. List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of *Merodon atratus* complex.

	COI хаплотипови [ДНК кодови] / COI haplotypes [DNA codes]
<i>M. balkanicus</i>	Hap14 [AU151 AU149 Gun23 Gun24], Hap15 [AU150 Gun21 Gun22 Gun25]
<i>M. atratus</i>	Hap1 [N8 N68 N65 N53 N2 N27 N14 AU517 AU516 AU515 AU514 AU512 AU510 AU509 AU507 Gun39 Gun37], Hap2 [N72], Hap3 [AU513], Hap4 [AU511]
<i>M. virgatus</i>	Hap5 [M50], Hap6 [AU145], Hap7 [AU147], Hap8 [M51 AU543 Gun26 Gun27 Gun28 AU144 AU142 AU241], Hap9 [AU552 AU550 AU547 AU546 AU545 AU544], Hap10 [AU553], Hap11 [AU542], Hap12 [AU540], Hap13 [AU146]



Слика 20. Median-joining мрежа COI хаплотипова *Merodon atratus* комплекса. / Figure 20. Median-joining network of COI haplotypes of *Merodon atratus* complex.

AMOVA је указала на значајну варијабилност између врста. 94,06% укупне варијабилности комплекса чини варијабилност између анализираних врста. Индекс фиксације је $F_{ST}=0,94061$. Поређењем парова *M. balkanicus*/*M. atratus*, *M. balkanicus*/*M. virgatus* и *M. atratus*/*M. virgatus* добијене су статистички значајне вредности F_{ST} (ниво значајности $p \leq 0,05$) (Таб. 19).

Табела 19. Вредности индекса фиксације (F_{ST}) између парова врста *Merodon atratus* комплекса. / Table 19. The values of fixation index between species and/or supposed species pairs within *Merodon atratus* complex.

	1.	2.	3.
1. <i>M. balkanicus</i>		*	*
2. <i>M. atratus</i>	0,96783		*
3. <i>M. virgatus</i>	0,94179	0,92716	

*ниво значајности $p \leq 0,05$ / significance level $p \leq 0,05$



6.3.3. *Merodon aerarius*

Анализирано је 77 COI секвенци дужине 1321bp. Укупан број варијабилних позиција је 34, од чега су 23 позиције парсимонија информативне. Укупан број хаплотипова је 27 (Таб. 21, Сл. 21). Диверзитет хаплотипова износи $Hd=0,884$, просечан број разлика $K=4,064$, а диверзитет нуклеотида $Pi=0,00308$. Параметри генетичког полиморфизма врсте *M. aerarius* по регионима приказани су у Табели 20.

Табела 20. Параметри генетичког полиморфизма врсте *Merodon aerarius* по регионима. / Table 20. Parameters of genetic polymorphism of *Merodon aerarius* species for regions.

	N	S	h	Hd	K	Pi
континентална Италија / continental Italy	10	5	3	0,51111	1,62222	0,00123
Сардинија / Sardinia	14	3	4	0,49451	0,54945	0,00042
Корзика / Corsica	16	5	4	0,35000	0,62500	0,00047
Велебит / Velebit Mt.	10	9	5	0,75556	2,64444	0,00200
Стара пл. / Stara Mt.	7	3	4	0,80952	1,14286	0,00087
Морињ / Morinj	3	9	3	1,00000	6,00000	0,00456
Орјен / Orjen Mt.	16	10	6	0,73333	2,10000	0,00159

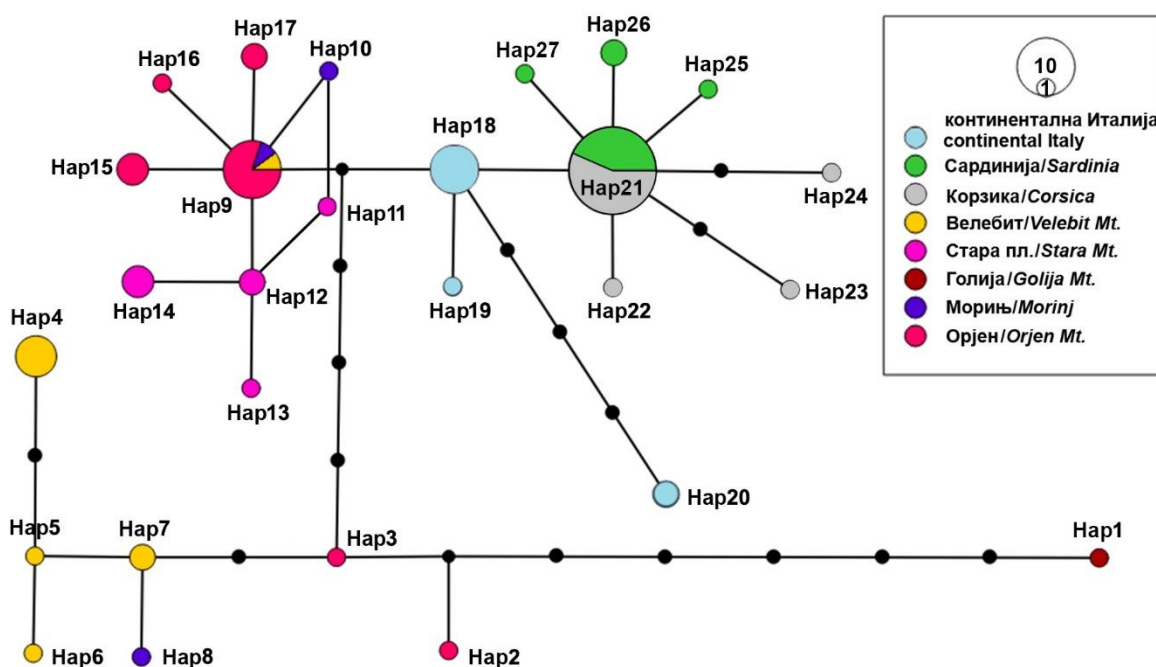
N - број секвенци / number of sequences; S - број полиморфних позиција / number of polymorphic sites; h - број хаплотипова / number of haplotypes; Hd - диверзитет хаплотипова / haplotype diversity; K - просечан број разлика / average number of differences; Pi - диверзитет нуклеотида / nucleotide diversity.

На *Median-joining* мрежи COI хаплотипова издваја се хаплотипска група региона Италије. Ова хаплотипска група обухвата две подгрупе: континенталну Италију са 3 јединствена хаплотипа (Нар18, Нар19 и Нар20) и острвску (Корзика и Сардинија) са 7 јединствених хаплотипова (Нар21 - Нар27). Хаплотипови Нар9 - Нар17, чине другу хаплотипску групу која такође обухвата две подгрупе. Прва подгрупа (Нар9, Нар10, Нар15 - Нар17) доминантна је у Црној Гори (Орјен и Морињ), али се хаплотип Нар9 јавља и на Велебиту, у Хрватској. Друга подгрупа обухвата за Стару планину јединствене хаплотипове, Нар11 - Нар14. Трећа хаплотипска група је заступљена на Орјену и чине је Нар2 и Нар3. На Велебиту је заступљена четврта хаплотипска група (Нар4 - Нар7) док је Нар8 из ове групе забележен у Морињу. Нар1 се највише издваја у односу на поменуте хаплотипске групе (6-12 мутационих корака) и одговара узорку пронађеном на планини Голија, у југозападној Србији (Таб. 21, Сл. 21).



Табела 21. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена врсте *Merodon aerarius*. / Table 21. List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of *Merodon aerarius*.

Регија / Region	COI хаплотипови [ДНК кодови] / COI haplotypes [DNA codes]
континентална Италија / continental Italy	Hap18 [AU152 AU153 AU154 AU156 AU209 AU880 AU881], Hap19 [AU155], Hap20 [AU210 AU211]
Сардинија / Sardinia	Hap21 [AU1375 AU1377 AU1378 AU1380 AU1384 AU1386 AU1387 AU1389 AU1390 AU1391] Hap25 [AU1379], Hap26 [AU1385 AU1388], Hap27 [AU1383]
Корзика / Corsica	Hap21 [AU1343 AU1345 AU1346 AU1347 AU1348 AU1349 AU1350 AU1351 AU1352 AU1354 AU1356 AU1357 AU1359], Hap22 [AU1355], Hap23 [AU1358], Hap24 [AU1353]
Велебит / Velebit Mt.	Hap4 [AU219 AU220 AU221 AU222 AU226], Hap5 [AU225], Hap6 [AU223], Hap7 [AU224 AU230], Hap9 [AU231],
Стара пл. / Stara Mt.	Hap11 [AU874], Hap12 [AU212 AU214], Hap13 [AU158], Hap14 [AU157 AU161 AU213]
Голија / Golija Mt.	Hap1 [AU1341]
Морињ / Morinj	Hap8 [AU206], Hap9 [AU205], Hap10 [AU207]
Орјен / Orjen Mt.	Hap2 [AU203], Hap3 [AU202], Hap9 [AU195 AU199 AU201 AU245 AU246 AU247 AU862 AU864], Hap15 [AU197 AU198 AU865], Hap16 [AU861], Hap17 [AU200 AU863]



Слика 21. Median-joining мрежа COI хаплотипова врсте *Merodon aerarius*. / Figure 21. Median-joining network of COI haplotypes of *Merodon aerarius*.

AMOVA је показала да 66.24% укупне варијабилности чини варијабилност између дефинисаних *M. aerarius* популација, док 33.76% је варијабилност унутар популација.



Индекс фиксације је $F_{ST}=0.66242$. Поређењем F_{ST} вредности парова популација утврђене су статистички значајне разлике између свих парова популација, осим Сардиније и Корзике, као и Мориња и Оријена (ниво значајности $p \leq 0,05$) (Таб. 22).

Табела 22. Вредности индекса фиксације (F_{ST}) између парова популација *Merodon aerarius*. / Table 22. The values of fixation index between pairs of populations within *Merodon aerarius*.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
1. Италија / <i>Italy</i>		*	*	*	*	*	*
2. Сардинија / <i>Sardinia</i>	0,53032		-	*	*	*	*
3. Корзика / <i>Corsica</i>	0,52596	0,01772		*	*	*	*
4. Велебит / <i>Velebit Mt.</i>	0,68627	0,79983	0,80252		*	*	*
5. Стара пл. / <i>Stara Mt.</i>	0,69245	0,85002	0,84345	0,72858		*	*
6. Морињ / <i>Morinj</i>	0,45011	0,70876	0,71171	0,30151	0,39948		-
7. Орјен / <i>Orjen Mt.</i>	0,49787	0,6721	0,67463	0,60393	0,38835	0,04983	

*ниво значајности: $p \leq 0,05$ / significance level $p \leq 0,05$

6.3.4. Варијабилност секвенци 28S рРНК гена у *Merodon cinereus* подгрупи

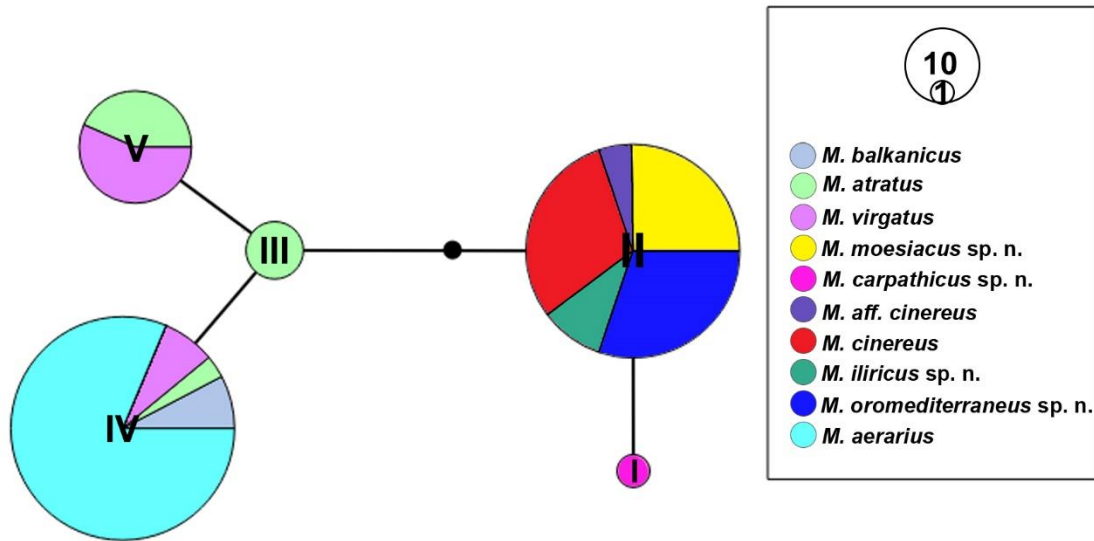
Анализа 28S рРНК гена за *M. cinereus* подгрупу укључивала је 206 секвенци. Поравнате секвенце не садрже празне позиције (енг. *gap*), те је укупна дужина секвенци 578 бр. Укупан број варијабилних позиција је 5 и све су парсимонија информативне. Дефинисано је 5 генотипова (Сл. 22, Таб. 23), а диверзитет генотипова (Gd) је 0,628. Диверзитет нуклеотида (Pi) је 0,00292.

Median-joining мрежа 28S генотипова показује одвајање генотипова *M. cinereus* комплекса и *M. atratus* комплекса. *M. cinereus* комплекс обухвата генотипове I и II, при чему генотип I одговара само *M. carpathicus* sp. n. и одвојен је једним мутационим кораком од генотипа II. *M. atratus* комплекс обухвата генотипове III, IV и V, при чему *M. atratus* одговарају сва три генотипа, *M. virgatus* IV и V, док *M. balkanicus* одговара само генотип IV. Врста *M. aerarius* има само један генотип, генотип IV који дели са врстама из *M. atratus* комплекса. Генотипови IV и V су одвојени са једним мутационим кораком од генотипа III, а међусобно са два мутациона корака. Генотипови *M. cinereus* комплекса и *M. atratus* комплекса су раздвојени са два мутациона корака (Сл. 22).



Табела 23. Преглед генотипова 28S рДНК за *Merodon cinereus* подгрупу. / Table 23. List of 28S genotypes of *Merodon cinereus* subgroup.

28S генотипови / 28S genotypes	ДНК кодови / DNA codes	
I	AU884 AU1443	<i>M. carpathicus</i> sp. n.
	AU529 AU530 AU531 AU532 AU533 AU534 AU535 AU536 AU537 AU538 AU1335 AU1337 AU1338 AU1339 AU1340 AU237 AU238 AU239 AU240 AU557 AU558	<i>M. moesiacus</i> sp. n.
	AU521 AU1365 AU1366 AU1371	<i>M. aff. cinereus</i>
II	AU215 AU216 AU360 AU361 AU362 AU508 AU522 AU523 AU524 AU525 AU526 AU1369 AU1370 AU1372 AU1373 AU1395 AU1397 AU1404 AU1405 AU1406 AU1408 AU1409 AU1410 AU1411 AU1413	<i>M. cinereus</i>
	AU1331 AU1332 AU1333 AU1334 AU1336 AU1362 AU1363 AU1364	<i>M. iliricus</i> sp. n.
	AU218 AU227 AU228 AU229 AU232 AU233 AU234 AU236 AU242 AU243 AU248 AU249 AU250 AU251 AU252 AU527 AU554 AU555 Gun29 Gun30 Gun31 Gun32 Gun33 Gun34 Gun35	<i>M. oromediterraneus</i> sp. n.
IV	AU151 AU150 Gun25 Gun24 Gun23 Gun22 Gun21	<i>M. balkanicus</i>
	N68 N53 N14	
III	N72 N65 N27 N8 N2 Gun39	<i>M. atratus</i>
	AU517 AU516 AU515 AU514 AU513 AU512 AU511 AU509 AU507 Gun37	
V	AU543 AU542 AU540 M50 Gun28 Gun27 Gun26 AU147 AU146 AU145 AU144 AU142 AU241	<i>M. virgatus</i>
	AU553 AU552 AU550 AU547 AU546 AU545 AU544	
IV	AU152 AU153 AU154 AU155 AU156 AU157 AU158 AU161 AU195 AU197 AU198 AU199 AU200 AU201 AU202 AU203 AU205 AU206 AU207 AU209 AU210 AU211 AU212 AU213 AU214 AU219 AU220 AU221 AU222 AU223 AU224 AU225 AU226 AU230 AU231 AU245 AU246 AU247 AU861 AU862 AU863 AU864 AU865 AU874 AU880 AU881 AU1341 AU1343 AU1345 AU1346 AU1347 AU1348 AU1349 AU1350 AU1351 AU1352 AU1354 AU1355 AU1356 AU1357 AU1358 AU1359 AU1375 AU1377 AU1378 AU1379 AU1380 AU1384 AU1385 AU1386 AU1387 AU1388 AU1389 AU1390 AU1391	<i>M. aerarius</i>



Слика 22. Median-joining мрежа 28S генотипова *Merodon cinereus* подгрупе. / Figure 22. Median-joining network of 28S genotypes of *Merodon cinereus* subgroup.



6.4. *Merodon bessarabicus* подгрупа

6.4.1. *Merodon luteomaculatus* комплекс

6.4.1.1. Анализа COI секвенци *Merodon luteomaculatus* комплекса

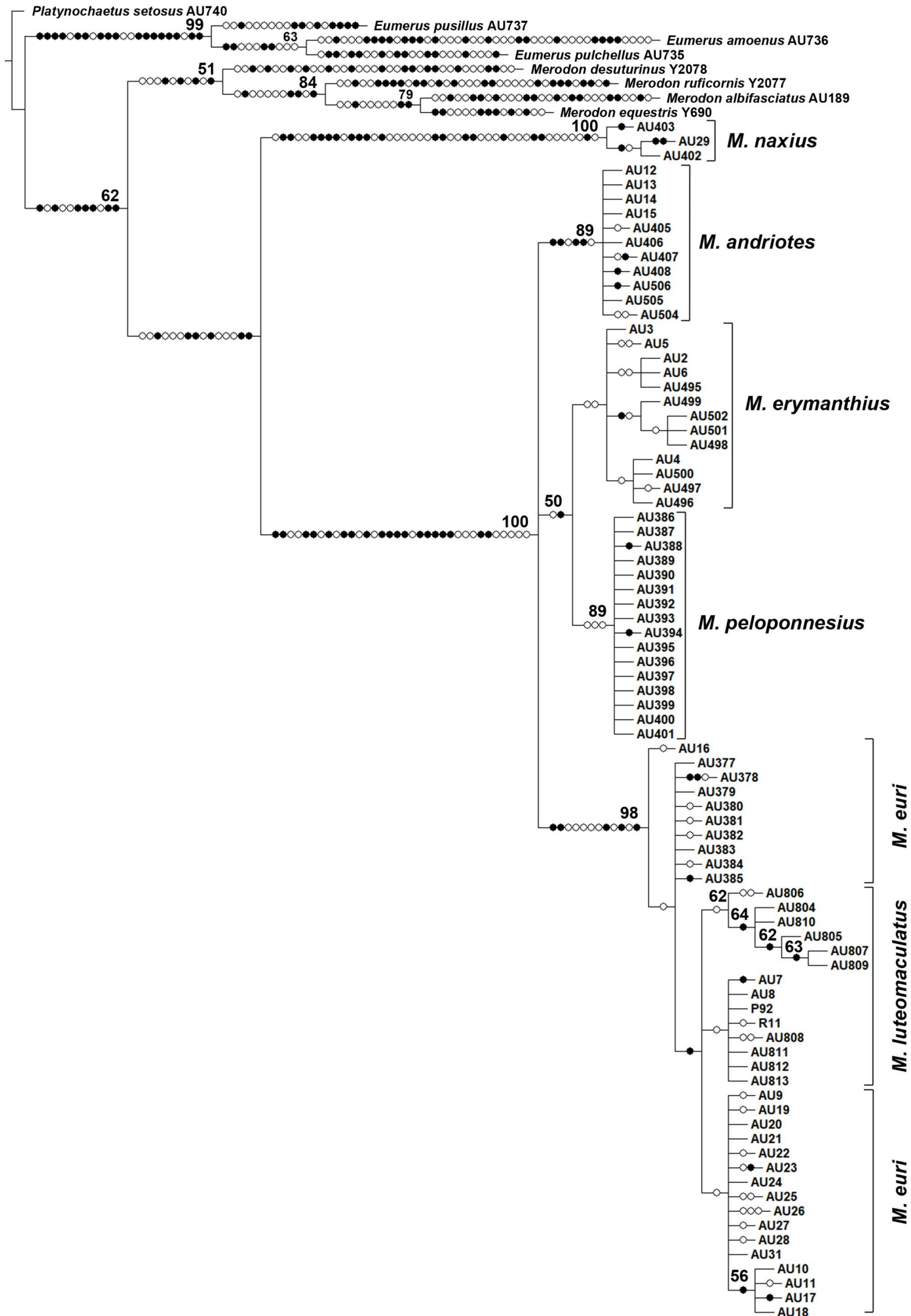
Сет 83 комбиноване COI секвенце дужине 1271 bp анализиран је методом максималне парсимоније. Као резултат конструисано је 36 стабала једнаке парсимоније (енг. *equally parsimonious*). Дужина стабала је 712 корака (CI=61, RI=85) док је консензус (*Strict consensus*) стабло дужине 722 корака (CI=60, RI=85) (Сл. 23). Додатно су конструисана ML и NJ филогенетска стабла са нешто другачијом топологијом (Сл. 24 и П5 у Прилогу 2). На стаблима су јасно уочљива два главна кластера која одговарају *M. naxius* са једне стране и кластеру који обухвата остале врсте *M. luteomaculatus* комплекса. Унутар другог главног кластера *M. luteomaculatus* и *M. euri* заједно формирају једну кладу, док су *M. andriotes*, *M. peloponnesius* и *M. erymanthius* јасно одвојени у посебне класе. *M. naxius* и *M. andriotes* су ендеми за Грчка острва Наксос и Андрос, док су *M. peloponnesius* и *M. erymanthius* присутне на Пелопонезу. *M. erymanthius* везује се за планински регион Еримантос. *M. luteomaculatus* и *M. euri* су континенталне врсте. *M. euri* је шире распрострањена (налази из Србије, Црне Горе, Грчке), док је *M. luteomaculatus* нађена на планини Орјен у Црној Гори (Сл. П3 у Прилогу 3).

Некориговане просечне вредности дистанци (p - *uncorrected pairwise distance*) у оквиру *M. luteomaculatus* комплекса кретале су се од 0,3% између *M. luteomaculatus* и *M. euri* до 9,3% између пара *M. luteomaculatus* и *M. naxius*, и пара *M. peloponnesius* и *M. naxius* (Таб. 24).

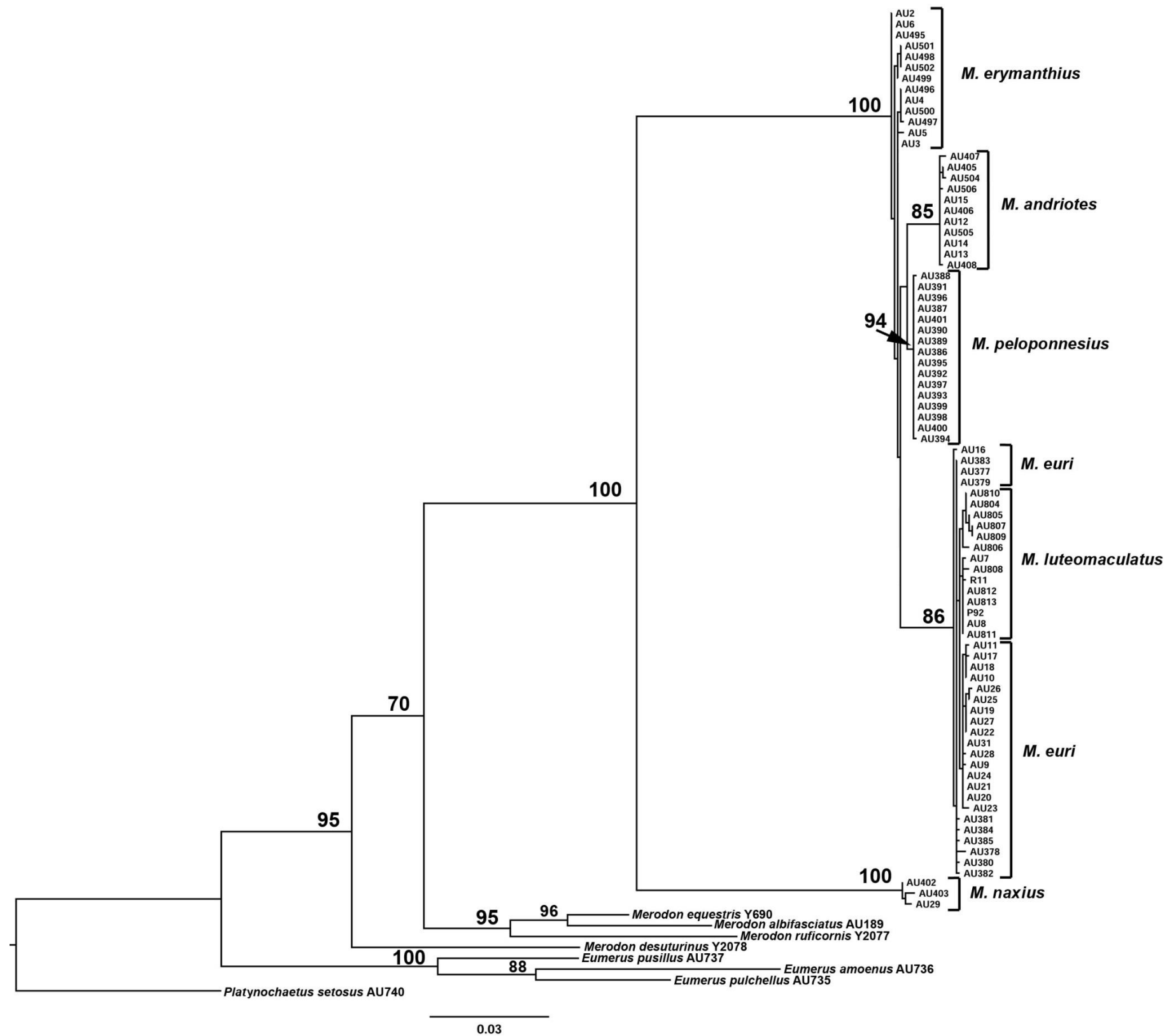
Табела 24. Некориговане просечне вредности дистанци (p - *uncorrected pairwise distance*) између парова врста *Merodon luteomaculatus* комплекса. / Table 24. *Uncorrected pairwise distances between species pairs within Merodon luteomaculatus complex.*

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1. <i>M. luteomaculatus</i>		0,001	0,004	0,003	0,004	0,008
2. <i>M. euri</i>	0,003		0,003	0,003	0,004	0,008
3. <i>M. peloponnesius</i>	0,019	0,018		0,002	0,003	0,008
4. <i>M. erymanthius</i>	0,018	0,017	0,005		0,003	0,008
5. <i>M. andriotes</i>	0,022	0,022	0,010	0,011		0,008
6. <i>M. naxius</i>	0,093	0,092	0,093	0,090	0,092	

p дистанца - испод дијагонале; стандардно одступање - изнад дијагонале. / *p distance - below diagonal; standard deviation - above diagonal.*



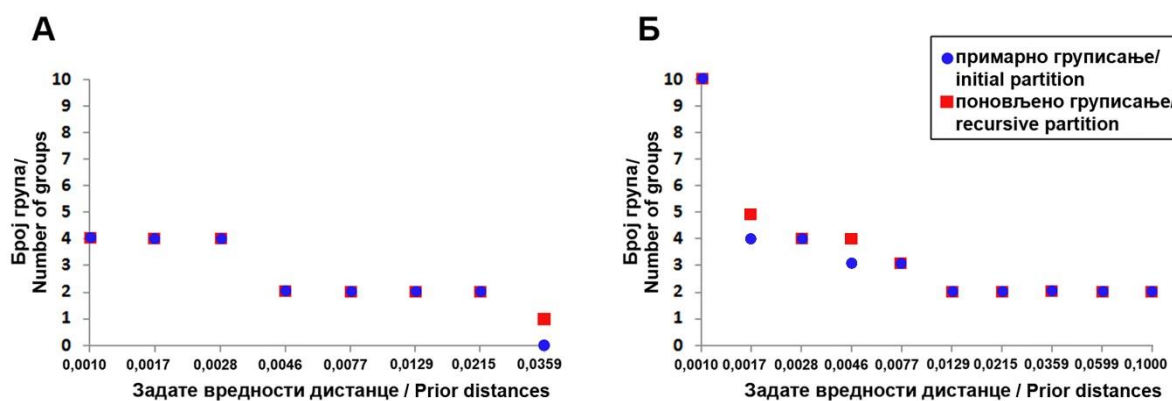
Слика 23. *Strict consensus* COI стабло од 36 једнаких стабала добијених анализом парсимоније за *Merodon luteomaculatus* комплекс. Дужина: 722 корака, *Consistency index* (CI) 60, *Retention index* (RI) 85. *Bootstrap* вредности ≥ 50 приказане су поред чворова. Испуњени кругови представљају карактере који нису хомоплазије, празни кругови представљају хомоплазије. / *Figure 23. Strict consensus COI tree of 36 equally parsimonious trees of Merodon luteomaculatus complex. Length: 715 steps, Consistency index (CI) 60, Retention index (RI) 85. The bootstrap values ≥ 50 are indicated near nodes. Filled circles represent non-homoplasious characters, open circles are homoplasious characters.*



Слика 24. Maximum-likelihood COI стабло за *Merodon luteomaculatus* комплекс. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / Figure 24. Maximum-likelihood COI tree of *Merodon luteomaculatus* complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.



ABGD анализом некоригованих p дистанци, као и дистанци израчунатих применом T92 модела и K80 модела извршено је груписање секвенци у хипотетичке врсте на основу присуства баркод шупљине. T92 је примењен уз гама ($G=0,05$) корекцију еволуционе стопе. За вредности p дистанце 0,001 - 0,0028 дефинисане су четири групе које одговарају *M. luteomaculatus*+*M. euri*, *M. peloponnesius*+*M. erymanthius*, *M. andriotes* и *M. naxius* (Сл. 25А). Применом T92+G (Сл. 25Б) и K 80 дистанци за задату вредност 0,0017 примарним груписањем добијене су четири групе, а поновљеним груписањем је дефинисано 5 група које одговарају *M. luteomaculatus*+*M. euri*, *M. peloponnesius*, *M. erymanthius*, *M. andriotes* и *M. naxius*.



Слика 25. Утврђивање присуства баркод шупљине (енг. *barcoding gap*) применом задатог опсега вредности дистанци унутар *Merodon luteomaculatus* комплекса. А) некоригована p дистанца; Б) T92+G. / Figure 25. Determination of barcoding gap presence by applying a given range of distance values within the *Merodon luteomaculatus* complex. А) uncorrected p distance; Б) T92+G.

У сету поравнатих COI секвенци од 1271 позиције 154 су варијабилне, док је од тог броја 141 позиција информативна за парсимонију. Укупан број хаплотипова је 45 (Таб. 25 и 26). Диверзитет хаплотипова комплекса износи $Hd=0,95886$, просечан број нуклеотидних разлика $K=6,74082$, а диверзитет нуклеотида $Pi=0,01743$ (Таб. 25).



Табела 25. Параметри генетичког полиморфизма за *Merodon luteomaculatus* комплекс. /
 Table 25. Parameters of genetic polymorphism of *Merodon luteomaculatus* complex.

	N	S	h	Hd	K	Pi
<i>M. luteomaculatus</i>	14	10	8	0,86813	3,02198	0,00238
<i>M. euri</i>	26	19	18	0,96000	2,91692	0,00229
<i>M. peloponnesius</i>	16	2	3	0,24167	0,25000	0,00020
<i>M. erymanthius</i>	13	7	7	0,88462	2,38462	0,00188
<i>M. andriotes</i>	11	6	6	0,72727	1,23636	0,00097
<i>M. naxius</i>	3	6	3	1,00000	4,00000	0,00315
комплекс / <i>complex</i>	83	154	45	0,95886	6,74082	0,01743

N - број секвенци / *number of sequences*; S - број полиморфних позиција / *number of polymorphic sites*; h - број хаплотипова / *number of haplotypes*; Hd - диверзитет хаплотипова / *haplotype diversity*; K - просечан број нуклеотидних разлика / *average number of nucleotide differences*; Pi - диверзитет нуклеотида / *nucleotide diversity*.

Median-joining мрежа хаплотипова показује груписање хаплотипова у 5 група. Прву групу чине хаплотипови *M. luteomaculatus* и *M. euri*. Упркос чињеници да поменуте врсте формирају једну хаплотипску групу, немају дељених хаплотипова. Друга хаплотипска група обухвата хаплотипове *M. erymanthius* и удаљена је 16 мутационих корака од прве групе. Трећу хаплотипску групу чине три хаплотипа врсте *M. peloponnesius*, која је од претходне две групе удаљена 20 и 5 мутационих корака. Четврта хаплотипска група је удаљена од претходно поменуте три 27 (од прве хаплотипске групе), 12 (од друге хаплотипске групе) и 11 (од треће хаплотипске групе) мутационих корака (Таб. 26, Сл. 26).



Табела 26. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена за *Merodon luteomaculatus* комплекс. / Table 26. List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of *Merodon luteomaculatus* complex.

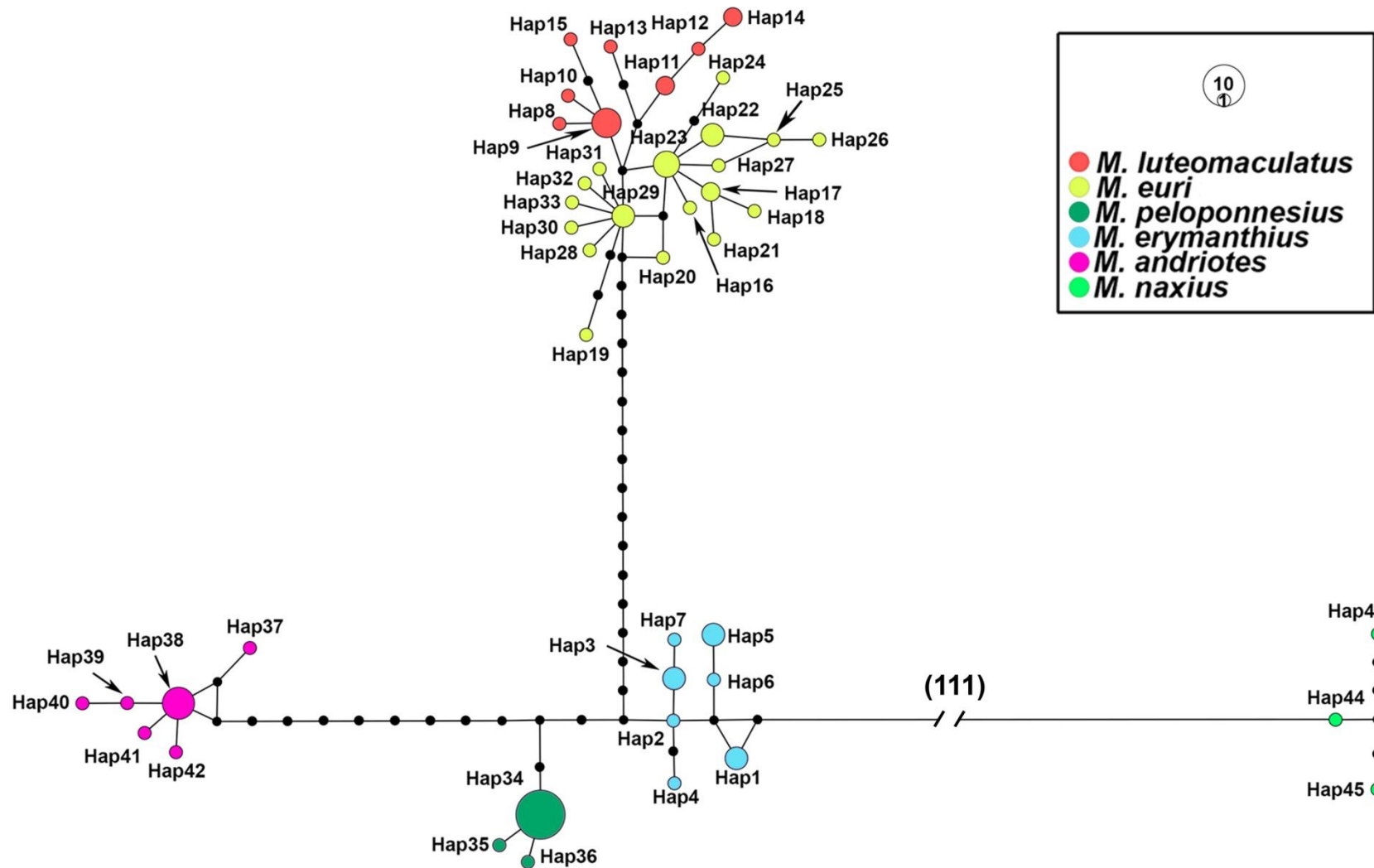
COI хаплотипови [ДНК кодови] / COI haplotypes [DNA codes]	
<i>M. luteomaculatus</i>	Hap8 [AU7], Hap9 [AU8 P92 AU811 AU812 AU813], Hap10 [R11], Hap11 [AU804 AU810], Hap12 [AU805], Hap13 [AU806], Hap14 [AU807 AU809], Hap15 [AU808]
<i>M. euri</i>	Hap16 [AU9], Hap17 [AU10 AU18], Hap18 [AU11], Hap19 [AU378], Hap20 [AU16], Hap21 [AU17], Hap22 [AU19 AU22 AU27], Hap23 [AU20 AU21 AU24 AU31], Hap24 [AU23], Hap25 [AU25], Hap26 [AU26], Hap27 [AU28], Hap28 [AU385], Hap29 [AU377 AU379 AU383], Hap30 [AU384], Hap31 [AU380], Hap32 [AU381], Hap33 [AU382]
<i>M. peloponnesius</i>	Hap34 [AU386 AU387 AU389 AU390 AU391 AU392 AU393 AU395 AU396 AU397 AU398 AU399 AU400 AU401], Hap35 [AU394], Hap36 [AU388]
<i>M. erymanthius</i>	Hap1 [AU2 AU6 AU495], Hap2 [AU3], Hap3 [AU4 AU500 AU496], Hap4 [AU5], Hap5 [AU502 AU501 AU498], Hap6 [AU499], Hap7 [AU497]
<i>M. andriotes</i>	Hap37 [AU407], Hap38 [AU12 AU13 AU14 AU15 AU406 AU505], Hap39 [AU405], Hap40 [AU504], Hap41 [AU408], Hap42 [AU506]
<i>M. naxius</i>	Hap43 [AU403], Hap44 [AU402], Hap45 [AU29]

AMOVA анализом потврђена је генетичка структурираност која је утврђена филогентским анализама и конструкцијом мреже хаплотипова. Вредност индекса фиксације за *M. luteomaculatus* комплекс је $\Phi_{ST}=0,92091$. Поређењем парова врста добијене су Φ_{ST} вредности у опсегу од 0,29777 (*M. luteomaculatus* и *M. euri*) до 0,99412 (*M. peloponnesius* и *M. naxius*). Све вредности Φ_{ST} су статистички значајне (ниво значајности $p \leq 0,05$) (Таб. 27).

Табела 27. Вредности индекса фиксације (Φ_{ST}) између парова врста *Merodon luteomaculatus* комплекса. / Table 27. The values of fixation index between species pairs within *Merodon luteomaculatus* complex.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1. <i>M. luteomaculatus</i>		*	*	*	*	*
2. <i>M. euri</i>	0,29777		*	*	*	*
3. <i>M. peloponnesius</i>	0,93549	0,91763		*	*	*
4. <i>M. erymanthius</i>	0,87964	0,87387	0,82548		*	*
5. <i>M. andriotes</i>	0,92061	0,91189	0,94879	0,87027		*
6. <i>M. naxius</i>	0,97337	0,97440	0,99412	0,97703	0,98535	

*ниво значајности: $p \leq 0,05$ / significance level: $p \leq 0,05$

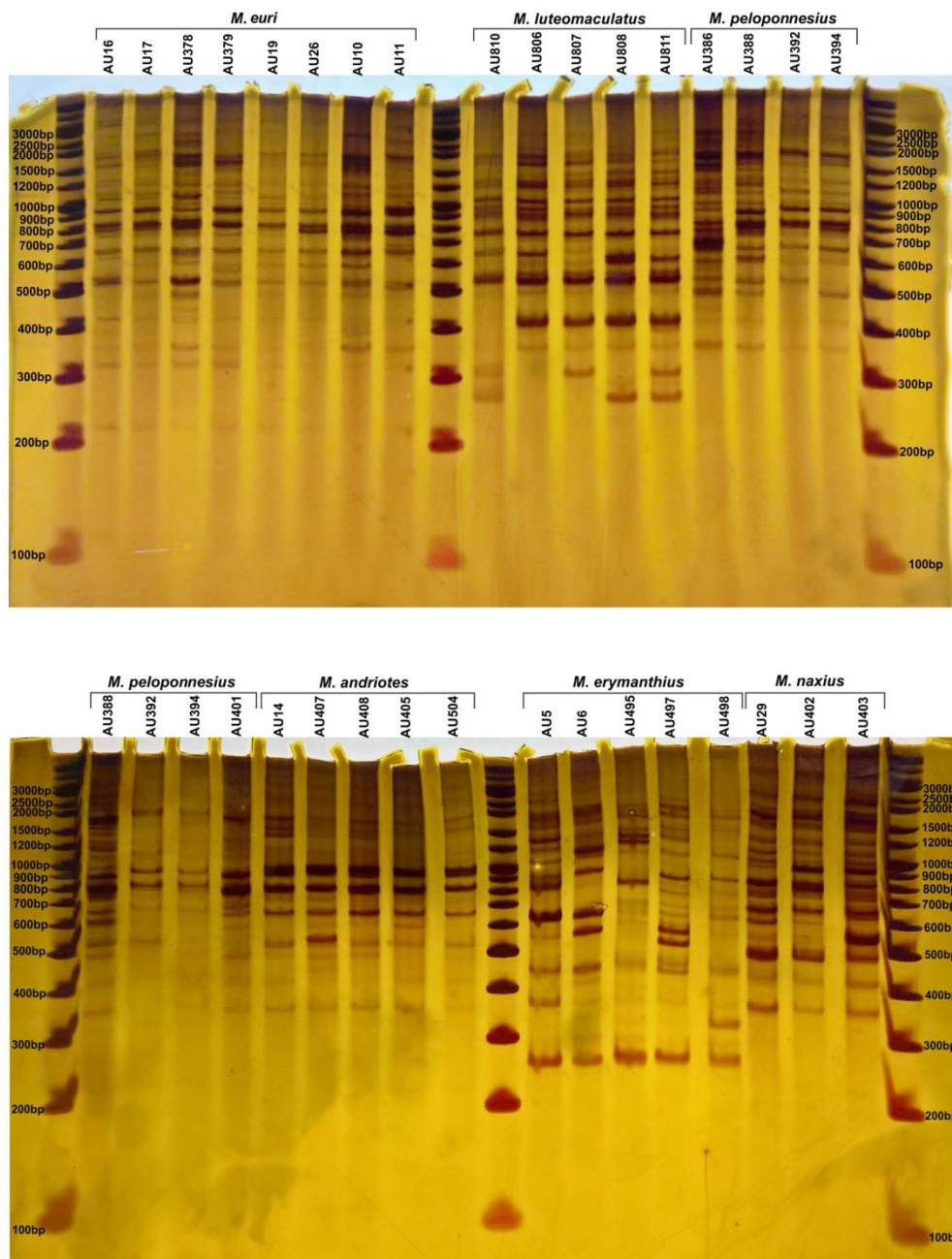


Слика 26. Median-joining мрежа COI хаплотипова *Merodon luteomaculatus* комплекса. / Figure 26. Median-joining network of COI haplotypes of *Merodon luteomaculatus* complex.



6.4.1.2. Анализа ISSR профила *Merodon luteomaculatus* комплекса

Утврђени су ISSR профили за 31 узорак шест врста *M. luteomaculatus* комплекса (5 узорака по врсти су изабрани по принципу случајности, осим за *M. euri* (8) и *M. naxius* (3)). Генерисани профили на гелу обухватали су траке у опсегу дужина од 210bp до 2.500bp (Сл. 27) из ког је детектована 21 позиција трака за читавање ISSR профила.

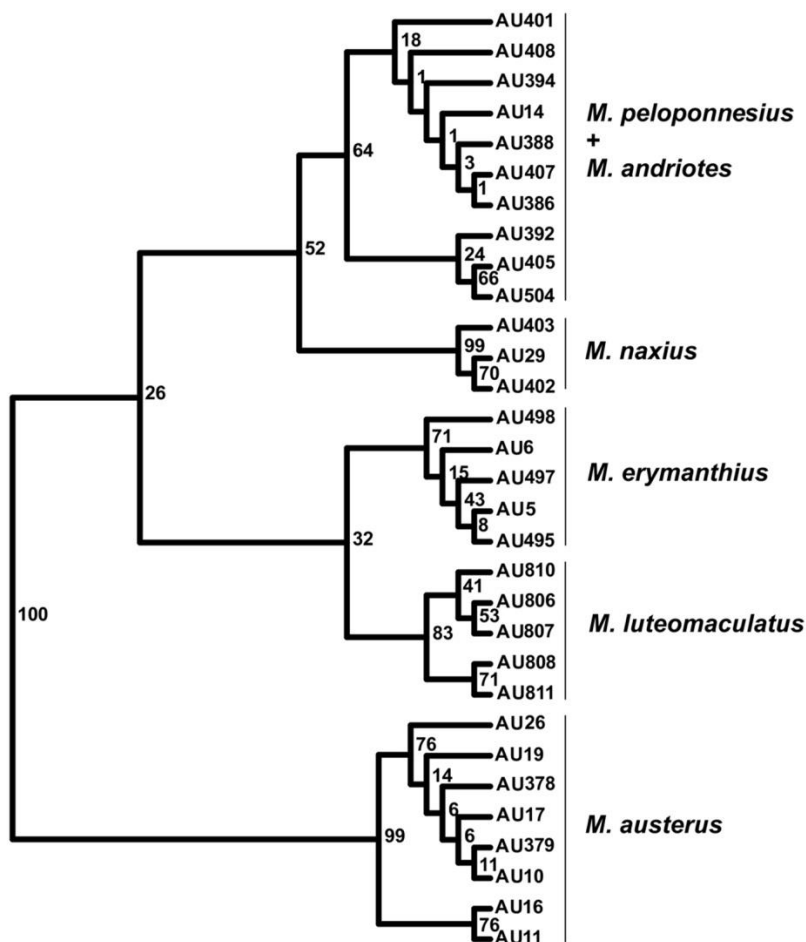


Слика 27. ISSR профили врста *Merodon luteomaculatus* комплекса. / Figure 27. ISSR profile of the *Merodon luteomaculatus* species complex.



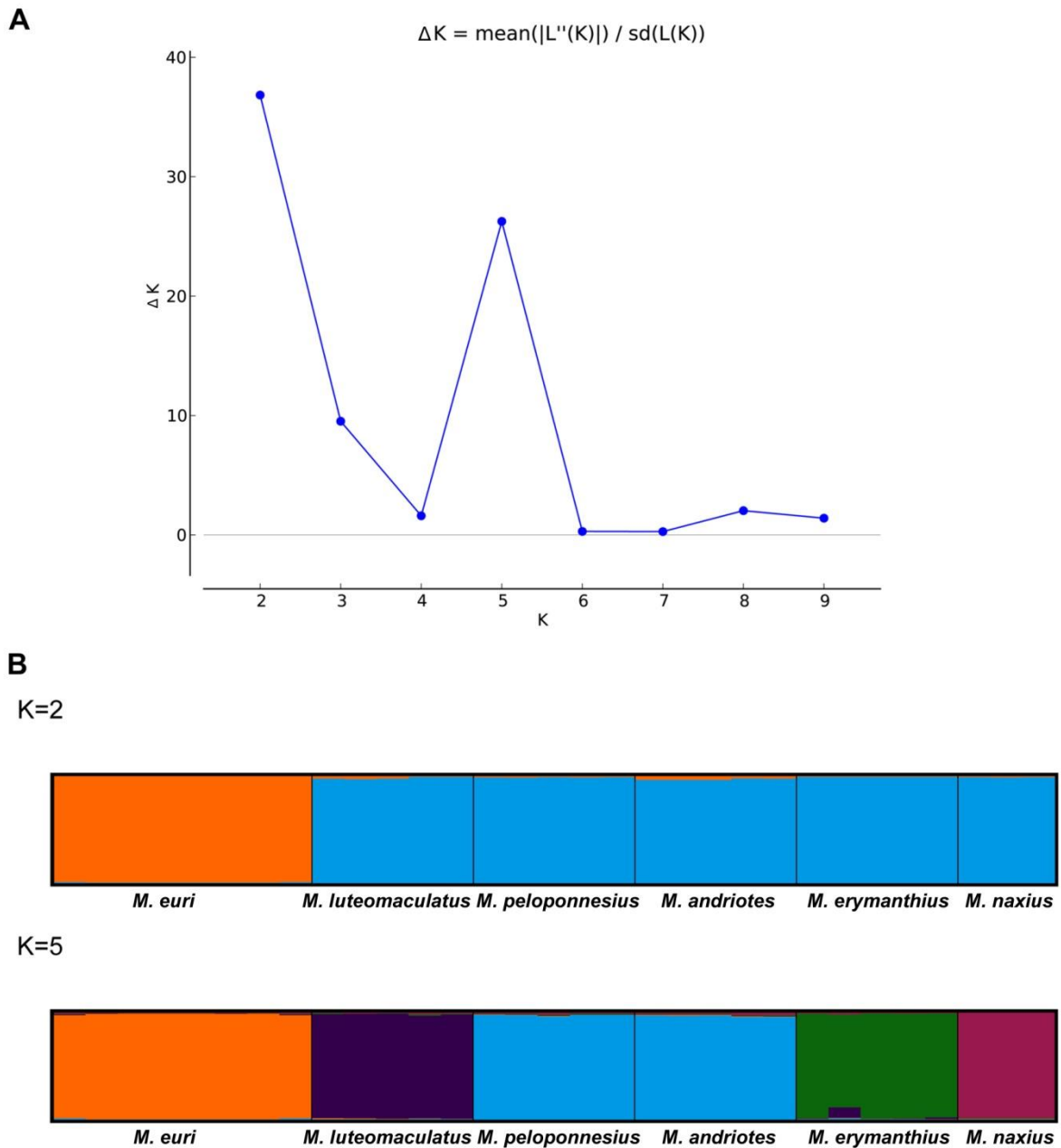
АМОВА анализом је потврђена висока варијабилност између врста (86,24%) са F_{ST} вредношћу 0,86236 указујући на статистички значајну диференцијацију ($p < 0.05$). Детектована варијабилност унутар врста била је 13,76%.

UPGMA кластер анализом базираном на Nei-Li коефицијенту генетичке дистанце очитаних података добијено је пет кластера који одговарају *M. euri*, *M. luteomaculatus*, *M. erymanthius*, *M. naxius* и *M. peloponnesius*+*M. andriotes* (Сл. 28).



Слика 28. ISSR UPGMA стабло *Merodon luteomaculatus* комплекса конструисано применом Nei-Li коефицијента генетичке дистанце. / Figure 28. ISSR UPGMA dendrogram of *Merodon luteomaculatus* complex constructed using the Nei-Li coefficient of genetic distance.

Бајесова кластер анализа укључена у STRUCTURE програм потврдила је највероватнију вредност $K=2$, док је секундарни пик одређен за вредност $K=5$ (Сл. 29А). За $K=2$, *M. euri* формира један кластер, док сви остали таксони формирају други кластер (Сл. 29В). За $K=5$, узорци су подељени у пет кластера (Сл. 29В) који одговарају кластерима добијеним на Nei-Li UPGMA стаблу (Сл. 28).

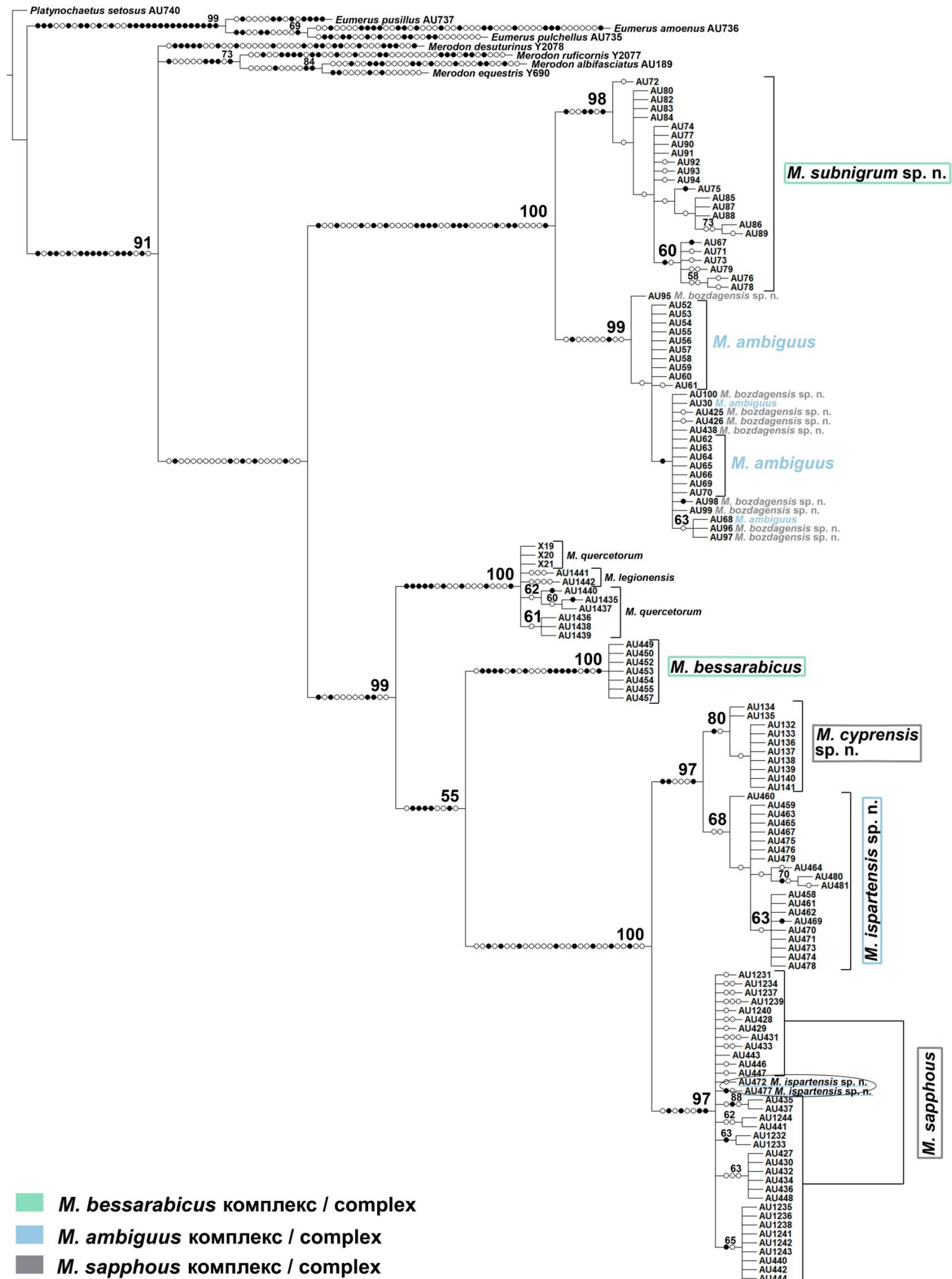


Слика 29. Генетичка структура између врста *Merodon luteomaculatus* комплекса одређена анализом ISSR профила. А) ΔK функција броја кластера; В) Графички приказ генетичке структуре за $K=2$ и $K=5$. / Figure 29. Genetic structure among species of the *Merodon luteomaculatus* complex resolved by ISSR profiles analysis. A) ΔK function of the number of clusters; B) The graphical display of genetic structuring for $K=2$ and $K=5$.

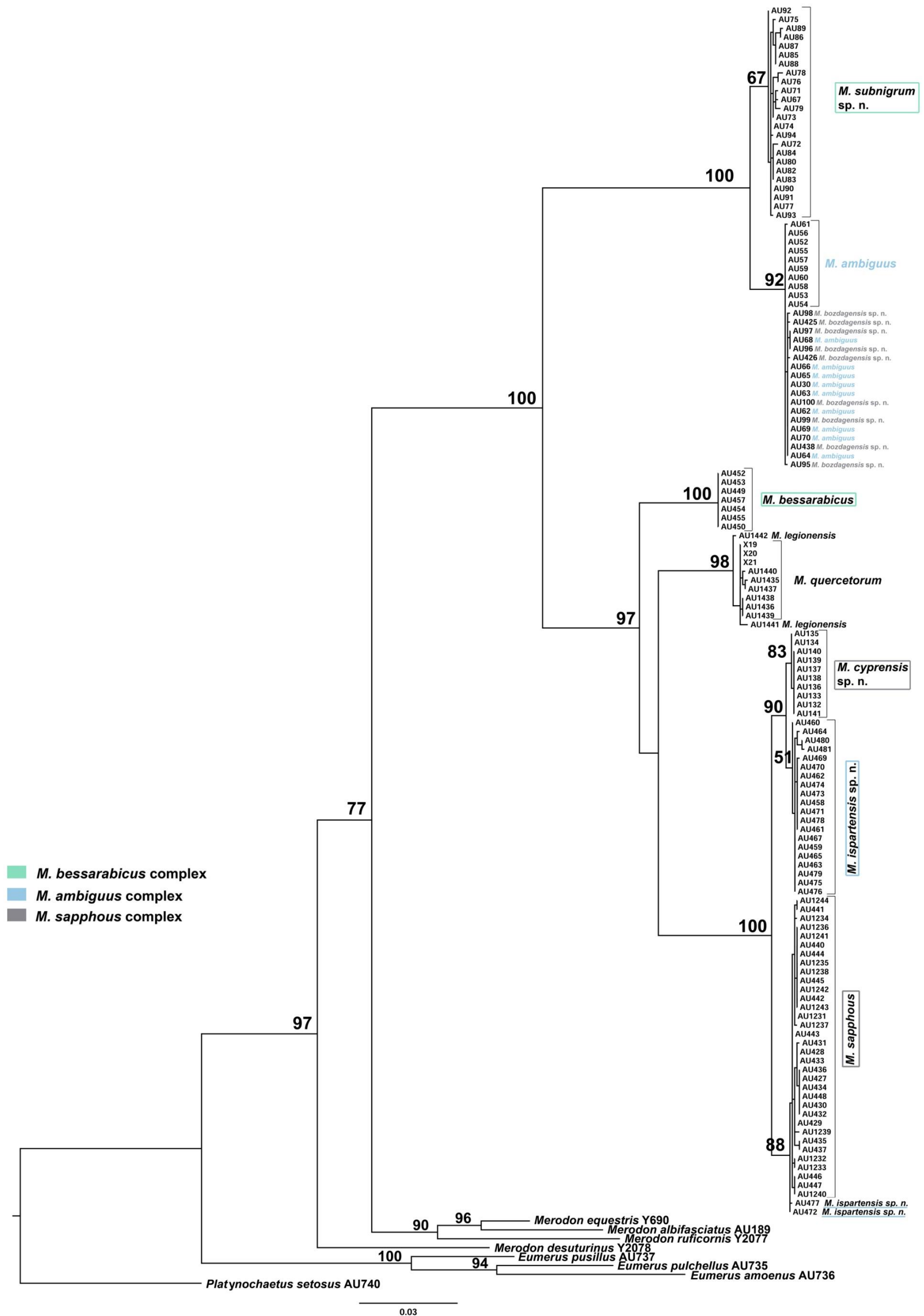


6.4.2. *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* и *M. ambiguus* комплекси

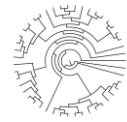
Анализа је обухватила 136 секвенци добијених комбиновањем 3' и 5' COI секвенци. Укупна дужина секвенци је 1395 bp. Методом максималне парсимоније конструисано је 1716 стабала једнаке парсимоније (енг. *equally parsimonious*). Дужина стабала је 840 корака (CI=58, RI=95), док је консензус (*Strict consensus*) стабло дужине 864 корака (CI=56, RI=95) (Сл. 30). Припремљен сет секвенци је додатно анализиран ML и NJ методама за конструкцију филогенетских стабла (Сл. 31 и П6 у Прилогу 2). Разлике у топологији између стабала су мале и на сва три стабла се јасно могу уочити два главана кластера. Први кластер чине две кладе од којих једна одговара *M. subnigrum* sp. n., а друга *M. ambiguus*+*M. bozdagensis* sp. n. У оквиру другог кластера издваја се 5 клада: *M. quercetorum*+*M. legionensis*, *M. bessarabicus*, *M. cyprensis* sp. n., *M. ispartensis* sp. n. и *M. sapphous*. Унутар *M. sapphous* кладе су смештене и две јединке *M. ispartensis* sp. n. Врсте *M. ambiguus* и *M. ispartensis* sp. n. чине *M. ambiguus* комплекс. *M. ambiguus* је распрострањена на Балканском полуострву, док се *M. ispartensis* sp. n. јавља на Анатолијском полуострву. *M. bessarabicus* комплекс обухвата врсте *M. bessarabicus* и *M. subnigrum* sp. n., од којих *M. bessarabicus* је присутна на Анатолијском полуострву, а *M. subnigrum* sp. n. на Балканском полуострву. *M. sapphous*, *M. cyprensis* sp. n. и *M. bozdagensis* sp. n. чине *M. sapphous* комплекс. *M. sapphous* и *M. bozdagensis* sp. n. су присутне на Анатолијском полуострву, а *M. cyprensis* sp. n. је ендем острва Кипар. *M. quercetorum* и *M. legionensis* су врсте представници *M. bessarabicus* подгрупе са Пиринејског полуострва (Сл. П4 у Прилогу 3).



Слика 30. *Strict consensus* COI стабло од 1716 једнаких стабала добијених анализом парсимоније за *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* и *M. ambiguus* комплексе. Дужина: 864 корака, *Consistency index* (CI) 56, *Retention index* (RI) 95. *Bootstrap* вредности ≥ 50 приказане су поред чворова. Испуњени кругови представљају карактере који нису хомоплазије, празни кругови представљају хомоплазије. / *Figure 30. Strict consensus COI tree of 1716 equally parsimonious trees of Merodon bessarabicus, M. sapphous and M. ambiguus complexes. Length: 864 steps, Consistency index (CI) 56, Retention index (RI) 95. The bootstrap values ≥ 50 are indicated near nodes. Filled circles represent non-homoplasious characters, open circles are homoplasious characters.*



Слика 31. Maximum-likelihood COI стабло за *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* и *M. ambiguus* комплексе. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне класе приказане су поред чворова. / Figure 31. Maximum-likelihood COI tree of *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* and *M. ambiguus* complexes. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.



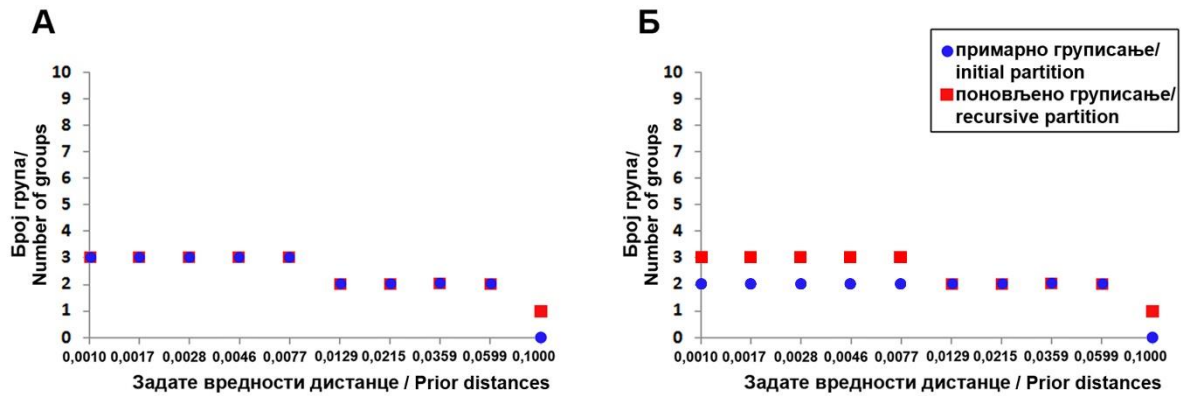
Вредности p дистанци између парова врста *M. bessarabicus*, *M. sapphous* и *M. ambiguus* комплекса, као и сваке од врста из ова три комплекса у односу на *M. quercetorum* и *M. legionensis* кретале су се од 0,1% између *M. ambiguus* и *M. bozdagensis* sp. n., до 8,9% између пара *M. ambiguus* и *M. ispartensis* sp. n., *M. ispartensis* sp. n. и *M. subnigrum* sp. n., *M. ispartensis* sp. n. и *M. bozdagensis* sp. n., као и пара *M. sapphous* и *M. bozdagensis* sp. n. (Таб. 28).

Табела 28. Некориговане просечне вредности дистанци (p - *uncorrected pairwise distance*) између парова врста *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* и *M. ambiguus* комплекса. / *Table 28. Uncorrected pairwise distances between species pairs within Merodon bessarabicus, M. sapphous and M. ambiguus complex.*

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
1. <i>M. ambiguus</i>		0,008	0,008	0,003	0,008	0,000	0,008	0,007	0,007
2. <i>M. ispartensis</i> sp. n.	0,089		0,006	0,008	0,003	0,008	0,001	0,006	0,006
3. <i>M. bessarabicus</i>	0,085	0,052		0,008	0,006	0,008	0,006	0,005	0,005
4. <i>M. subnigrum</i> sp. n.	0,017	0,089	0,082		0,008	0,003	0,008	0,007	0,007
5. <i>M. sapphous</i>	0,088	0,013	0,051	0,088		0,008	0,003	0,006	0,006
6. <i>M. bozdagensis</i> sp. n.	0,001	0,089	0,085	0,017	0,089		0,008	0,007	0,007
7. <i>M. cyprensis</i> sp. n.	0,087	0,005	0,052	0,087	0,013	0,087		0,006	0,006
8. <i>M. quercetorum</i>	0,082	0,051	0,041	0,078	0,051	0,082	0,053		0,001
9. <i>M. legionensis</i>	0,081	0,050	0,041	0,077	0,050	0,081	0,052	0,003	

p дистанца - испод дијагонале; стандардно одступање - изнад дијагонале. / *p distance - below diagonal; standard deviation - above diagonal.*

ABGD анализа секвенци *M. bessarabicus* комплекса раздвојила је врсте *M. bessarabicus* и *M. subnigrum* sp. n. за опсег задатих дистанци 0,001 - 0,0599 (0,1 за p дистанцу). Слично томе, код *M. sapphous* комплекса потврђене су врсте *M. sapphous*, *M. bozdagensis* sp. n. и *M. cyprensis* sp. n. (задате дистанце: 0,001 - 0,0028, идентично за p , T92 и K80 дистанце). Секвенце *M. ambiguus* комплекса су груписане у две групе које одговарају врстама *M. ambiguus* и *M. ispartensis* sp. n. за вредности дистанце 0,0129 - 0,0599 (идентично за p , T92+G (G=0,05) и K80 дистанце). За вредности дистанце 0,001 - 0,0077 иницијалним (T92+G (G=0,05) и K80) или поновљним (p дистанце) груписањем извршена је подела на три групе издвајањем секвенци AU472 и AU477 из *M. ispartensis* sp. n. (Сл. 32).



Слика 32. Утврђивање присуства баркод шупљине (енг. *barcoding gap*) применом задатог опсега вредности дистанци унутар *Merodon ambiguus* комплекса. А) некоригована р дистанца; Б) T92+G. / Figure 32. Determination of barcoding gap presence by applying a given range of distance values within the *Merodon ambiguus* complexes. А) uncorrected p distance; Б) T92+G.

Од укупно 1395 позиција 200 су варијабилне, од чега 190 су парсимонија информативне. Укупан број хаплотипова је 57 (Таб. 29 и 30). Диверзитет хаплотипова је $Hd=0,96939$, просечан број нуклеотидних разлика $K=71,97418$, а диверзитет нуклеотида $Pi=0,05159$ (Таб. 29).

Табела 29. Параметри генетичког полиморфизма за *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* и *M. ambiguus* комплексе. / Table 29. Parameters of genetic polymorphism of *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* and *M. ambiguus* complexes.

	N	S	h	Hd	K	Pi
<i>M. ambiguus</i>	19	3	4	0,62573	0,73684	0,00053
<i>M. ispartensis</i> sp. n.	22	24	9	0,78788	4,44589	0,00319
<i>M. bessarabicus</i>	7	0	1	0	0	0
<i>M. subnigrum</i> sp. n.	24	19	16	0,94565	3,32609	0,00238
<i>M. sapphous</i>	34	14	14	0,88057	3,00713	0,00216
<i>M. bozdagensis</i> sp. n.	9	6	6	0,88889	1,50000	0,00108
<i>M. cyprensis</i> sp. n.	10	1	2	0,35556	0,35556	0,00025
<i>M. quercetorum</i>	9	5	5	0,83333	1,83333	0,00131
<i>M. legionensis</i>	2	7	2	1,00000	7,00000	0,00502
укупна процена/total data estimate	136	200	57	0,96939	71,97418	0,05159

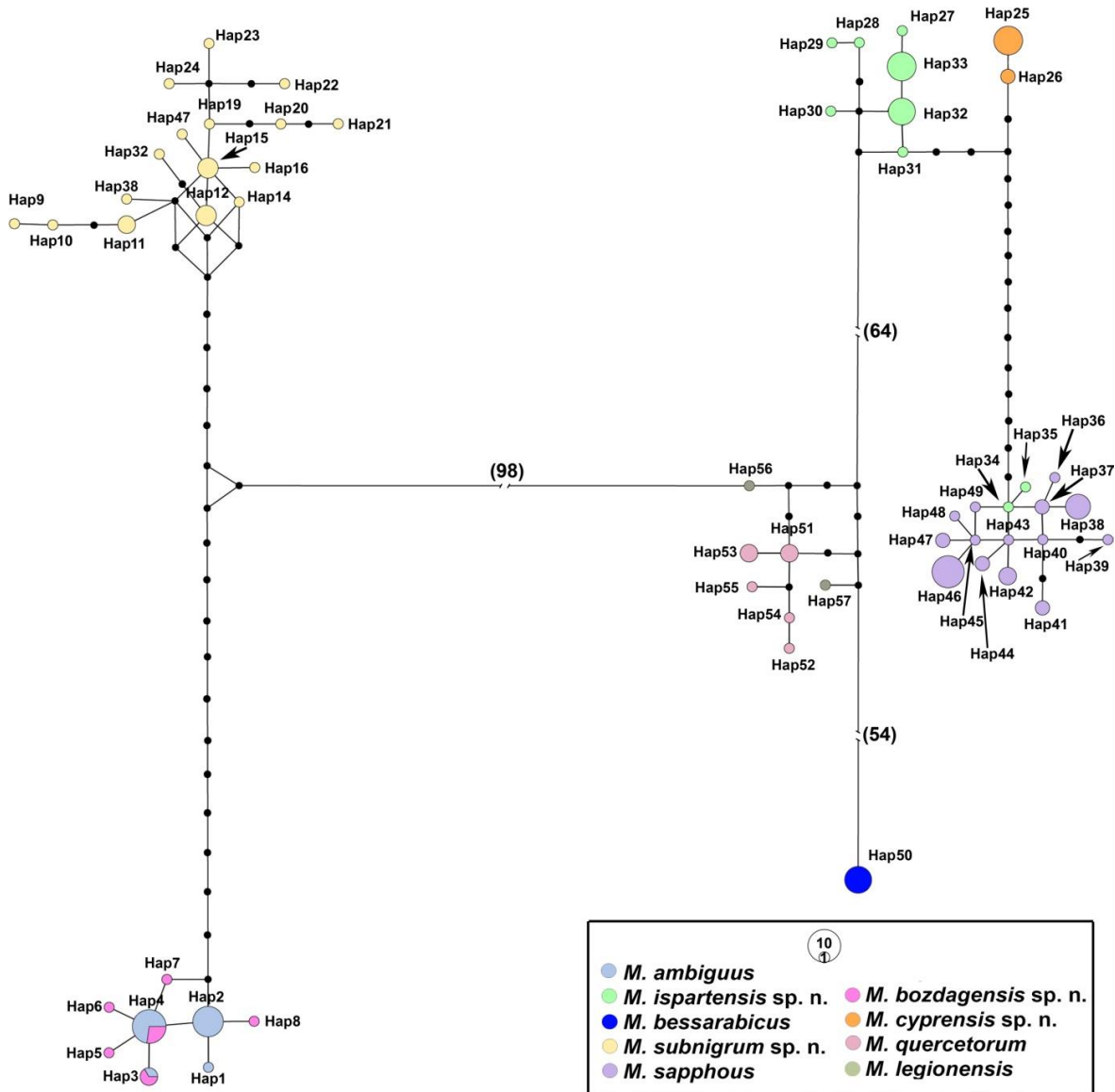
N - број секвенци / number of sequences; S - број полиморфних позиција / number of polymorphic sites; h - број хаплотипова / number of haplotypes; Hd - диверзитет хаплотипова / haplotype diversity; K - просечан број нуклеотидних разлика / average number of nucleotide differences; Pi - диверзитет нуклеотида / nucleotide diversity.



Утврђени COI хаплотипови формирају 4 главне групе на *Median-joining* мрежи. Прва група обухвата две подгрупе од којих је једна *M. subnigrum* sp. n., а друга *M. ambiguus*+*M. bozdagensis* sp. n. Друга група је од прве удаљена 98 мутационих корака и чине је хаплотипови Шпанских врста *M. quercetorum* и *M. legionensis*. Трећу хаплотипску групу чини хаплотип Нaр20 врсте *M. bessarabicus*. Нaр20 је удаљен 54 мутациона корака од друге хаплотипске групе, а 118 од четврте. Четврта хаплотипска група је удаљена 64 мутациона корака од друге и обухвата 3 подгрупе. Прву подгрупу четврте хаплотипске групе чине хаплотипови *M. ispartensis* sp. n. (Нaр21-25, Нaр28-29), другу хаплотипови *M. sapphous*, а трећу хаплотипови *M. cyprensis* sp. n. и два хаплотипа *M. ispartensis* sp. n. (Нaр26-27) (Таб. 30, Сл. 33).

Табела 30. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена за *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* и *M. ambiguus* комплексе. / Table 30. List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* and *M. ambiguus* complexes.

COI хаплотипови [ДНК кодови] / COI haplotypes [DNA codes]	
<i>M. ambiguus</i>	Нaр1 [AU61], Нaр2 [AU52 AU53 AU54 AU55 AU56 AU57 AU58 AU59 AU60], Нaр3 [AU68], Нaр4 [AU30 AU62 AU63 AU64 AU65 AU66 AU69 AU70]
<i>M. ispartensis</i> sp. n.	Нaр27 [AU469], Нaр28 [AU480], Нaр29 [AU481], Нaр30 [AU464], Нaр31 [AU460], Нaр32 [AU459 AU463 AU465 AU467 AU475 AU476 AU479], Нaр33 [AU458 AU461 AU462 AU470 AU471 AU473 AU474 AU478], Нaр34 [AU472], Нaр35 [AU477]
<i>M. bessarabicus</i>	Нaр50 [AU449 AU450 AU452 AU453 AU454 AU455 AU457]
<i>M. subnigrum</i> sp. n.	Нaр9 [AU85 AU87 AU88], Нaр10 [AU86], Нaр11 [AU89], Нaр12 [AU80 AU82 AU83 AU84], Нaр13 [AU75], Нaр14 [AU92], Нaр15 [AU74 AU77 AU90 AU91], Нaр16 [AU94], Нaр17 [AU93], Нaр18 [AU72], Нaр19 [AU73], Нaр20 [AU76], Нaр21 [AU78], Нaр22 [AU79], Нaр23 [AU67], Нaр24 [AU71]
<i>M. sapphous</i>	Нaр36 [AU431], Нaр37 [AU428 AU433], Нaр38 [AU427 AU430 AU432 AU434 AU436 AU448], Нaр39 [AU1239], Нaр40 [AU429], Нaр41 [AU435 AU437], Нaр42 [AU1240 AU446 AU447], Нaр43 [AU443], Нaр44 [AU1232 AU1233], Нaр45 [AU1231], Нaр46 [AU1235 AU1236 AU1238 AU1241 AU1242 AU1243 AU440 AU442 AU444 AU445], Нaр47 [AU1244 AU441], Нaр48 [AU1234], Нaр49 [AU1237]
<i>M. bozdagensis</i> sp. n.	Нaр3 [AU96 AU97], Нaр4 [AU100 AU438 AU99], Нaр5 [AU98], Нaр6 [AU425], Нaр7 [AU426], Нaр8 [AU95]
<i>M. cyprensis</i> sp. n.	Нaр25 [AU132 AU133 AU136 AU137 AU138 AU139 AU140 AU141], Нaр26 [AU134 AU135]
<i>M. quercetorum</i>	Нaр51 [X19 X20 X21], Нaр52 [AU1435], Нaр53 [AU1436 AU1438 AU1439], Нaр54 [AU1437], Нaр55 [AU1440]
<i>M. legionensis</i>	Нaр56 [AU1441], Нaр57 [AU1442]



Слика 33. Median-joining мрежа COI хаплотипова *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* и *M. ambiguus* комплексе. / Figure 33. Median-joining network of COI haplotypes of *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* and *M. ambiguus* complexes.

АМОВА анализа потврдила је генетичку структуру анализираних представника *M. bessarabicus* подгрупе. Вредност индекса фиксације је $\Phi_{ST}=0,97016$. Поређењем парова врста добијене су Φ_{ST} вредности у опсегу од 0,15170 (*M. ambiguus* и *M. bozdagensis* sp. n.) до 0,99707 (*M. bessarabicus* и *M. cyprensis* sp. n.). Све вредности Φ_{ST} су статистички значајне (ниво значајности $p \leq 0,05$) (Таб. 31).



Табела 31. Вредности индекса фиксације (Φ_{ST}) између парова врста *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* и *M. ambiguus* комплекса. / Table 31. The values of fixation index between species pairs within *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* and *M. ambiguus* complexes.

	1.	2.	3.	4.	5	6.	7.	8.	9.
1. <i>M. ambiguus</i>		*	*	*	*	*	*	*	*
2. <i>M. ispartensis</i> sp. n.	0,97799		*	*	*	*	*	*	*
3. <i>M. bessarabicus</i>	0,99534	0,95273		*	*	*	*	*	*
4. <i>M. subnigrum</i> sp. n.	0,90629	0,96899	0,97716		*	*	*	*	*
5. <i>M. sapphous</i>	0,98213	0,80471	0,96467	0,97452		*	*	*	*
6. <i>M. bozdagensis</i> sp. n.	0,15170	0,97094	0,99278	0,88235	0,97810		*	*	*
7. <i>M. cyprensis</i> sp. n.	0,99497	0,57764	0,99707	0,97967	0,97810	0,99264		*	*
8. <i>M. quercetorum</i>	0,99057	0,94816	0,98190	0,97311	0,96143	0,98545	0,98571		*
9. <i>M. legionensis</i>	0,99040	0,93439	0,98196	0,96746	0,95506	0,98115	0,98565	0,35252	

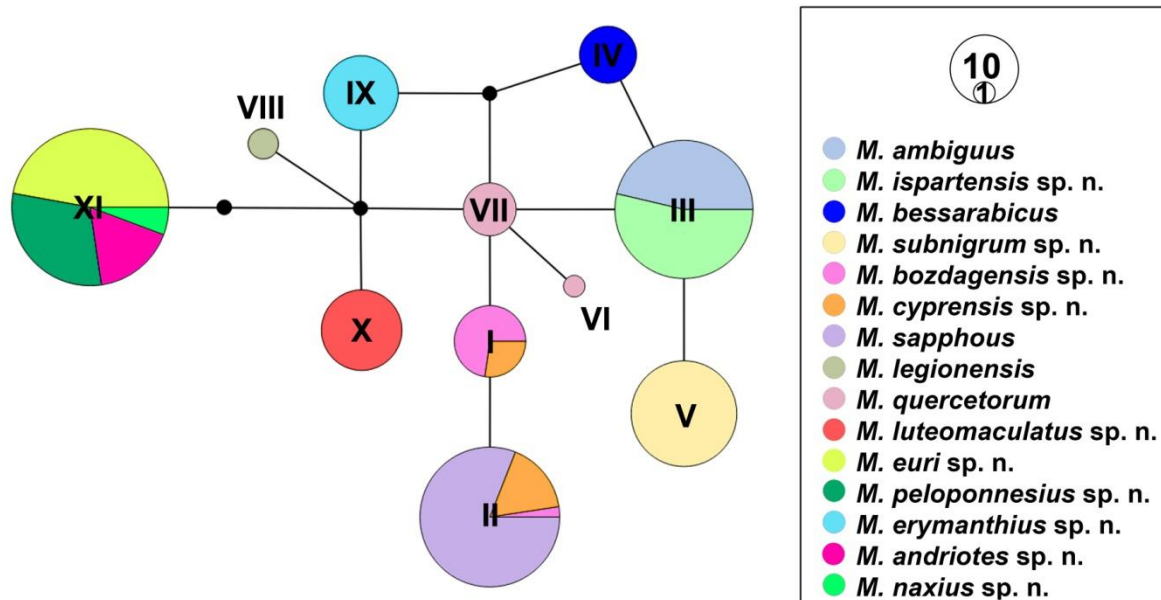
*ниво значајности: $p \leq 0,05$ / significance level: $p \leq 0,05$

6.4.3. Варијабилност 28S рДНК секвенци у *Merodon bessarabicus* подгрупи

Анализа 28S рРНК гена за *M. bessarabicus* подгрупу укључивала је 213 секвенци. Дужина поравнатих секвенци 581 bp. Укупан број анализираних позиција без празних позиција (енг. *gaps*) је 577 bp. Укупан број варијабилних позиција је 7, од чега је 6 парсимонија информативних. Дефинисано је 11 генотипова (Таб. 32), а диверзитет генотипова (Gd) је 0,8413. Диверзитет нуклеотида (Pi) је 0,00209. *Median-joining* мрежа 28S генотипова приказана је на Слици 34. Укупно 7 генотипова су јединствена за врсте: *M. bessarabicus* (IV), *M. subnigrum* sp. n. (V), *M. quercetorum* (VI, VII), *M. legionensis* (VIII), *M. erymanthius* (IX) и *M. luteomaculatus* (X). Генотип I је заједнички за врсте *M. bozdagensis* sp. n. и *M. cyprensis* sp. n., генотип II је заједнички за врсте *M. sapphous*, *M. bozdagensis* sp. n. и *M. cyprensis* sp. n., генотип III је заједнички за врсте *M. ambiguus* и *M. ispartensis* sp. n., а генотип XI је заједнички за врсте *M. euri*, *M. peloponnesius*, *M. naxius* и *M. andriotes*.

Табела 32. Преглед генотипова 28S рДНК за *Merodon bessarabicus* подгрупу. / Table 32. List of 28S genotypes of *Merodon bessarabicus* subgroup.

28S генотипови / 28S genotypes	ДНК кодови / DNA codes	Врста / Species
I	AU100 AU425 AU426 AU95 AU96 AU97 AU98 AU99	<i>M. bozdagensis</i> sp. n.
	AU136 AU138 AU139	<i>M. cyprensis</i> sp. n.
II	AU1231 AU1232 AU1233 AU1234 AU1235 AU1236 AU1237 AU1238 AU1239 AU1240 AU1241 AU1242 AU1243 AU1244 AU427 AU428 AU429 AU430 AU431 AU432 AU433 AU434 AU435 AU436 AU437 AU440 AU441 AU442 AU443 AU444 AU445 AU446 AU447 AU448	<i>M. sapphous</i>
	AU438	<i>M. bozdagensis</i> sp. n.
	AU132 AU133 AU134 AU135 AU137 AU140 AU141	<i>M. cyprensis</i> sp. n.
	AU30 AU52 AU53 AU54 AU55 AU56 AU57 AU58 AU59 AU60 AU61 AU62 AU63 AU64 AU65 AU66 AU68 AU69 AU70	<i>M. ambiguus</i>
III	AU458 AU459 AU460 AU461 AU462 AU463 AU464 AU465 AU467 AU469 AU470 AU471 AU472 AU473 AU474 AU475 AU476 AU477 AU478 AU479 AU480 AU481	<i>M. ispartensis</i> sp. n.
IV	AU449 AU450 AU452 AU453 AU454 AU455 AU457	<i>M. bessarabicus</i>
V	AU67 AU71 AU72 AU73 AU74 AU75 AU76 AU77 AU78 AU79 AU80 AU82 AU83 AU84 AU85 AU86 AU87 AU88 AU89 AU90 AU91 AU92 AU93 AU94	<i>M. subnigrum</i> sp. n.
VI	AU1435	<i>M. quercetorum</i>
VII	AU1436 AU1437 AU1438 AU1439 AU1440 X20	<i>M. legionensis</i>
VIII	AU1441 AU1442	<i>M. erymanthius</i>
IX	AU2 AU3 AU4 AU5 AU6 AU502 AU500 AU499 AU498 AU497 AU496 AU495	<i>M. erymanthius</i>
X	AU7 AU8 P92 R11 AU804 AU805 AU806 AU807 AU808 AU809 AU810 AU811 AU812 AU813	<i>M. luteomaculatus</i>
XI	AU10 AU11 AU16 AU17 AU18 AU19 AU20 AU21 AU22 AU23 AU24 AU25 AU26 AU27 AU28 AU31 AU377 AU378 AU379 AU380 AU381 AU382 AU383 AU384 AU385	<i>M. euri</i> sp. n.
	AU386 AU387 AU388 AU389 AU390 AU391 AU392 AU393 AU394 AU395 AU396 AU397 AU398 AU399 AU400 AU401	<i>M. peloponnesius</i>
	AU14 AU15 AU405 AU406 AU407 AU408 AU506 AU505 AU504	<i>M. andriotes</i>
	AU29 AU402 AU403	<i>M. naxius</i>



Слика 34. Median-joining мрежа 28S генотипова *Merodon bessarabicus* подгрупе. / Figure 34. Median-joining network of 28S genotypes of *Merodon bessarabicus* subgroup.



6.5. *Merodon chalybeus* комплекс

Анализа комбинованих 3' и 5' секвенци COI гена *M. chalybeus* комплекса укључивала је 52 секвенце. Укупна дужина поравнатих секвенци износи 1401 бр. Методом максималне парсимоније добијено је стабало дужине 719 корака, CI=62 и RI=87 (Сл. 35). Готово идентична топологија стабала добијена је применом ML и NJ метода конструкције (Сл. 36 и П7 у Прилогу 2). На стаблима се уочава раздвајање *M. chalybeus* кладе и кластера који чине *M. minutus* и *M. paulum* sp. n. Клада и кластер су подржани са високим *bootstrap* вредностима на сва три типа стабала (100/85/100 и 100/99/100). Додатно, у оквиру кластера (*M. minutus*)+(*M. paulum* sp. n.) са високом *bootstrap* подршком (98/93/100) одваја се *M. minutus* клада.

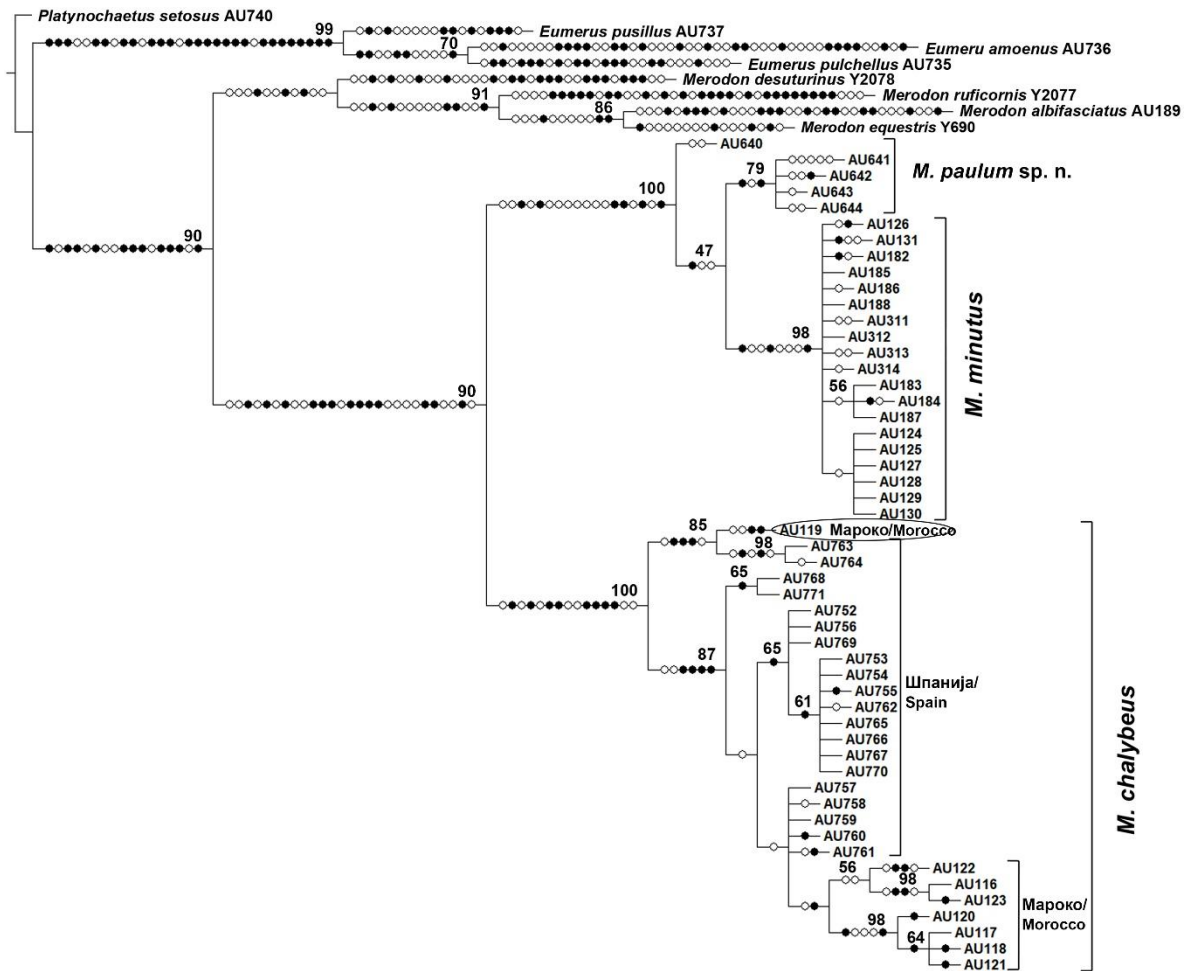
Просечне вредности *p* дистанци између парова врста *M. chalybeus* комплекса кретале су се од 1,2% између *M. minutus* и *M. paulum* sp. n., 4,2% између *M. chalybeus* и *M. paulum* sp. n., до 4,6% између *M. chalybeus* и *M. minutus* (Таб. 33).

Табела 33. Некориговане просечне вредности дистанци (*p* - *uncorrected pairwise distance*) између парова врста *Merodon chalybeus* комплекса. / Table 33. *Uncorrected pairwise distances between species pairs within Merodon chalybeus complex.*

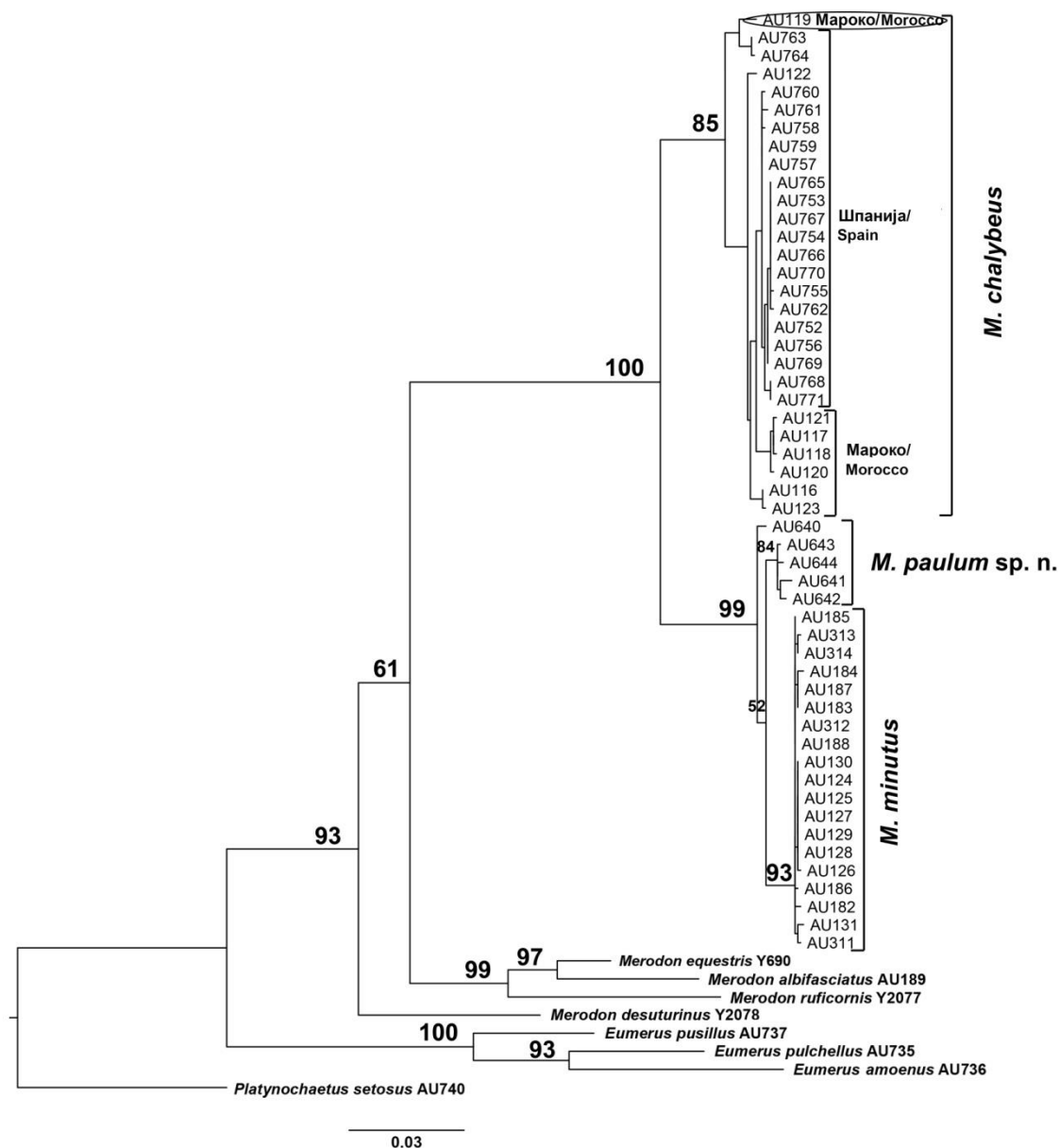
	1.	2.	3.
1. <i>M. chalybeus</i>		0,005	0,005
2. <i>M. minutus</i>	0,046		0,002
3. <i>M. paulum</i> sp. n.	0,042	0,012	

p дистанца - испод дијагонале; стандардно одступање - изнад дијагонале. / *p distance* - below diagonal; standard deviation - above diagonal.

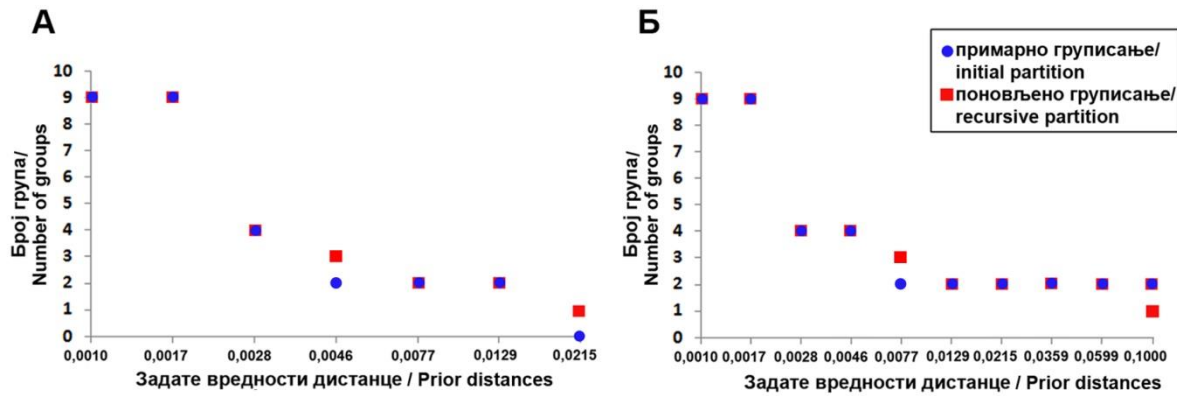
Секвенце *M. chalybeus* комплекса су АВГД анализом сврстане у две групе које одговарају *M. chalybeus* и *M. minutus*+*M. paulum* sp. n. (0,0077 - 0,0129 за *p* дистанце и K80; 0,0129 - 0,1 за T92+G, G=0,05). Груписање на већи број група за ниже вредности задатих дистанци није у складу са претпостављеним границама врста. Груписањем на три групе, *M. minutus*+*M. paulum* sp. n. нису раздвојене као засебне врсте, али је врста *M. chalybeus* подељена у две групе. За вредност *p* дистанце 0,0028 и 0,0028 - 0,0046 за T92+G дистанце добијене су четири групе које одговарају врстама *M. minutus*, *M. paulum* sp. n., групи која обухвата већину секвенци врсте *M. chalybeus* и групи коју чине AU119, AU763 и AU764 врсте *M. chalybeus* (Сл. 37).



Слика 35. *Strict consensus* COI стабло 10 једнаких стабала добијених анализом парсимоније за *Merodon chalybeus* комплекс. Дужина: 719 корака, *Consistency index* (CI) 62, *Retention index* (RI) 87. *Bootstrap* вредности ≥ 50 приказане су поред чворова. Испуњени кругови представљају карактере који нису хомоплазије, празни кругови представљају хомоплазије. / *Figure 35. Strict consensus COI tree of 10 equally parsimonious trees of Merodon chalybeus complex. Length: 719 steps, Consistency index (CI) 62, Retention index (RI) 87. The bootstrap values ≥ 50 are indicated near nodes. Filled circles represent non-homoplasious characters, open circles are homoplasious characters.*



Слика 36. *Maximum-likelihood* COI стабло за *Merodon chalybeus* комплекса. *Bootstrap* вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / *Figure 36. Maximum-likelihood* COI tree of *Merodon chalybeus* complex. The *bootstrap* values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.



Слика 37. Утврђивање присуства баркод празнине (енг. *barcoding gap*) применом задатог опсега вредности дистанци унутар *Merodon chalybeus* комплекса. А) некоригована р дистанца; Б) T92+G. / *Figure 37. Determination of barcoding gap presence by applying a given range of distance values within the Merodon chalybeus complex. A) uncorrected p distance; B) T92+G.*

Од укупно 1401 позиције анализираних COI секвенци 112 су варијабилне, а од тог броја 88 позиција су парсимонија информативне. Укупан број хаплотипова је 35, од чега 19 припада *M. chalybeus*, 11 *M. minutus* и 5 хаплотипова *M. paulum* sp. n. (Таб. 34 и 35). Диверзитет хаплотипова (Hd) комплекса износи 0,97059, просечан број нуклеотидних разлика (K) је 36,18100, а диверзитет нуклеотида (Pi) је 0,02583 (Таб. 34).

Табела 34. Параметри генетичког полиморфизма за *Merodon chalybeus* комплекс. / *Table 34. Parameters of genetic polymorphism of Merodon chalybeus complex.*

	N	S	h	Hd	K	Pi
1. <i>M. chalybeus</i>	28	50	19	0,94709	9,27249	0,00662
2. <i>M. minutus</i>	19	14	11	0,88889	2,22222	0,00159
3. <i>M. paulum</i> sp. n.	5	19	5	1,00000	8,00000	0,00571
комплекс/ <i>complex</i>	52	112	35	0,97059	36,18100	0,02583

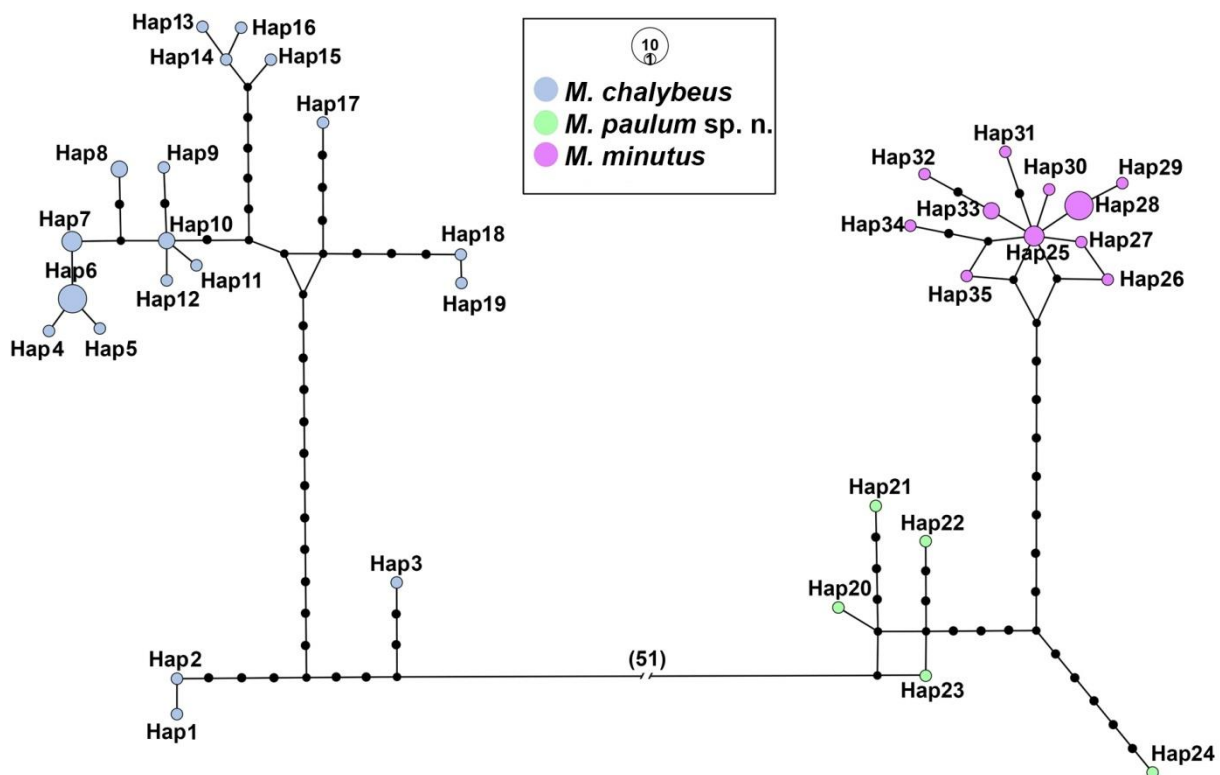
N - број секвенци / *number of sequences*; S - број полиморфних позиција / *number of polymorphic sites*; h - број хаплотипова / *number of haplotypes*; Hd - диверзитет хаплотипова / *haplotype diversity*; K - просечан број нуклеотидних разлика / *average number of nucleotide differences*; Pi - диверзитет нуклеотида / *nucleotide diversity*.

COI хаплотипска група *M. chalybeus* и хаплотипска група *M. minutus*+*M. paulum* sp. n. су на *Median-joining* мрежи одвојени са 51 мутационим кораком. Хаплотипска група *M. minutus* одвојена је од *M. paulum* sp. n. групе са 8 мутационих корака. Нема дељених хаплотипова (Сл. 38).



Табела 35. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена за *Merodon chalybeus* комплекс. / Table 35. List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of *Merodon chalybeus* complex.

COI хаплотипови [ДНК кодови] / COI haplotypes [DNA codes]	
<i>M. chalybeus</i>	Hap1 [AU764], Hap2 [AU763], Hap3 [AU119], Hap4 [AU755], Hap5 [AU762], Hap6 [AU753 AU754 AU765 AU766 AU767 AU770], Hap7 [AU752 AU756 AU769], Hap8 [AU768 AU771], Hap9 [AU761], Hap10 [AU757 AU759], Hap11 [AU758], Hap12 [AU760], Hap13 [AU118], Hap14 [AU117], Hap15 [AU120], Hap16 [AU121], Hap17 [AU122], Hap18 [AU116], Hap19 [AU123]
<i>M. minutus</i>	Hap25 [AU185 AU188 AU312], Hap26 [AU313], Hap27 [AU314], Hap28 [AU124 AU125 AU127 AU128 AU129 AU130], Hap29 [AU126], Hap30 [AU186], Hap31 [AU182], Hap32 [AU184], Hap33 [AU183 AU187], Hap34 [AU131], Hap35 [AU311]
<i>M. paulum</i> sp. n.	Hap20 [AU644], Hap21 [AU641], Hap22 [AU642], Hap23 [AU643], Hap24 [AU640]



Слика 38. Median-joining мрежа COI хаплотипова *Merodon chalybeus* комплекса. / Figure 38. Median-joining network of COI haplotypes of *Merodon chalybeus* complex.

AMOVA анализом тестирана је генетичка структурираност показана у филогентским анализама и конструкцијом мреже хаплотипова. Вредност индекса фиксације Φ_{ST} између врста је 0,88609. Поређењем парова врста добијене су Φ_{ST} вредности у опсегу од 0,79473 (*M. minutus* и *M. paulum* sp. n.) до 0,90042 (*M. chalybeus* и *M. minutus*). Све вредности Φ_{ST} су статистички значајне (ниво значајности $p \leq 0,05$) (Таб. 36).



Табела 36. Вредности индекса фиксације (F_{ST}) између парова врста *Merodon chalybeus* комплекса. / Table 36. The values of fixation index between species pairs within *Merodon chalybeus* complex.

	1.	2.	3.
1. <i>M. chalybeus</i>		*	*
2. <i>M. minutus</i>	0,90042		*
3. <i>M. paulum</i> sp. n.	0,84612	0,79473	

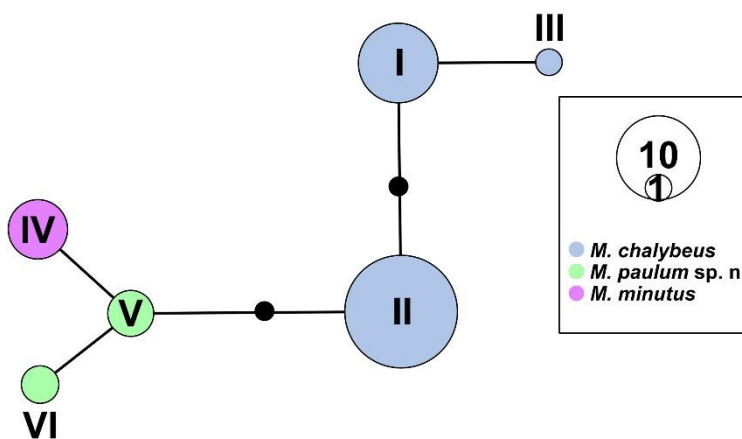
*ниво значајности: $p \leq 0,05$ / significance level: $p \leq 0,05$

Анализа 28S рРНК гена за *M. chalybeus* комплекс укључивала је 38 секвенци. Дужина секвенци је између 545 - 550 bp, док је дужина поравнатих секвенци 550 bp.

Присутне су 2 варијабилне позиције информативне за парсимонију. Дефинисано је 6 генотипова (Сл. 39, Таб. 37). Диверзитет генотипова (Gd) је 0,7112. Диверзитет нуклеотида (Pi) је 0,00062. Генотипови I, II и III јединствени су за *M. chalybeus*, генотип IV за *M. minutus*, а V и VI за *M. paulum* sp. n. (Сл. 39).

Табела 37. Преглед генотипова 28S рДНК за *Merodon chalybeus* комплекс. / Table 37. List of 28S genotypes of *Merodon chalybeus* complex.

28S генотипови / 28S genotypes	ДНК кодови / DNA codes	
I	AU752 AU753 AU754 AU755 AU764 AU765 AU766 AU767 AU770	<i>M. chalybeus</i>
II	AU756 AU757 AU758 AU760 AU761 AU762 AU763 AU768 AU769 AU771 AU116 AU117 AU118 AU119 AU120 AU121 AU122 AU123	
III	AU759	
IV	AU130 AU131 AU311 AU312 AU313	<i>M. minutus</i>
V	AU640 AU642 AU644	<i>M. paulum</i> sp. n.
VI	AU641 AU643	



Слика 39. Median-joining мрежа 28S генотипова *Merodon chalybeus* комплекса. /
Figure 39. Median-joining network of 28S genotypes of *Merodon chalybeus* complex.



6.6. *Merodon dobrogensis* подгрупа

За анализу *M. dobrogensis* подгрупе коришћено је 37 комбинованих 3' и 5' секвенци COI гена. Укупна дужина поравнатих секвенци износи 1400 bp. Методом максималне парсимоније добијено је стабло дужине 715 корака, CI=62 и RI=87 (Сл. 40). Поред тога конструисана су и ML и NJ филогенетска стабла (Сл. 41 и П8 у Прилогу 2). Методе MP и NJ резултовале су идентичном топологијом стабала, *M. rojoi* sp. n.+(*M. puniceus*+*M. dobrogensis*), уз извесне разлике у вредностима *bootstrap* подршке за појединачне кладе, *M. puniceus* 59/62 и *M. dobrogensis* 81/58. Топологија ML стабла је слична, али се клада *M. dobrogensis* одваја од *M. puniceus* са високом *bootstrap* подршком (90).

Израчунате просечне вредности *p* дистанци између парова врста *M. dobrogensis* подгрупе кретале су се од 0.8% између *M. puniceus* и *M. dobrogensis* до 8,8% између *M. rojoi* sp. n. и *M. dobrogensis* (Таб. 38).

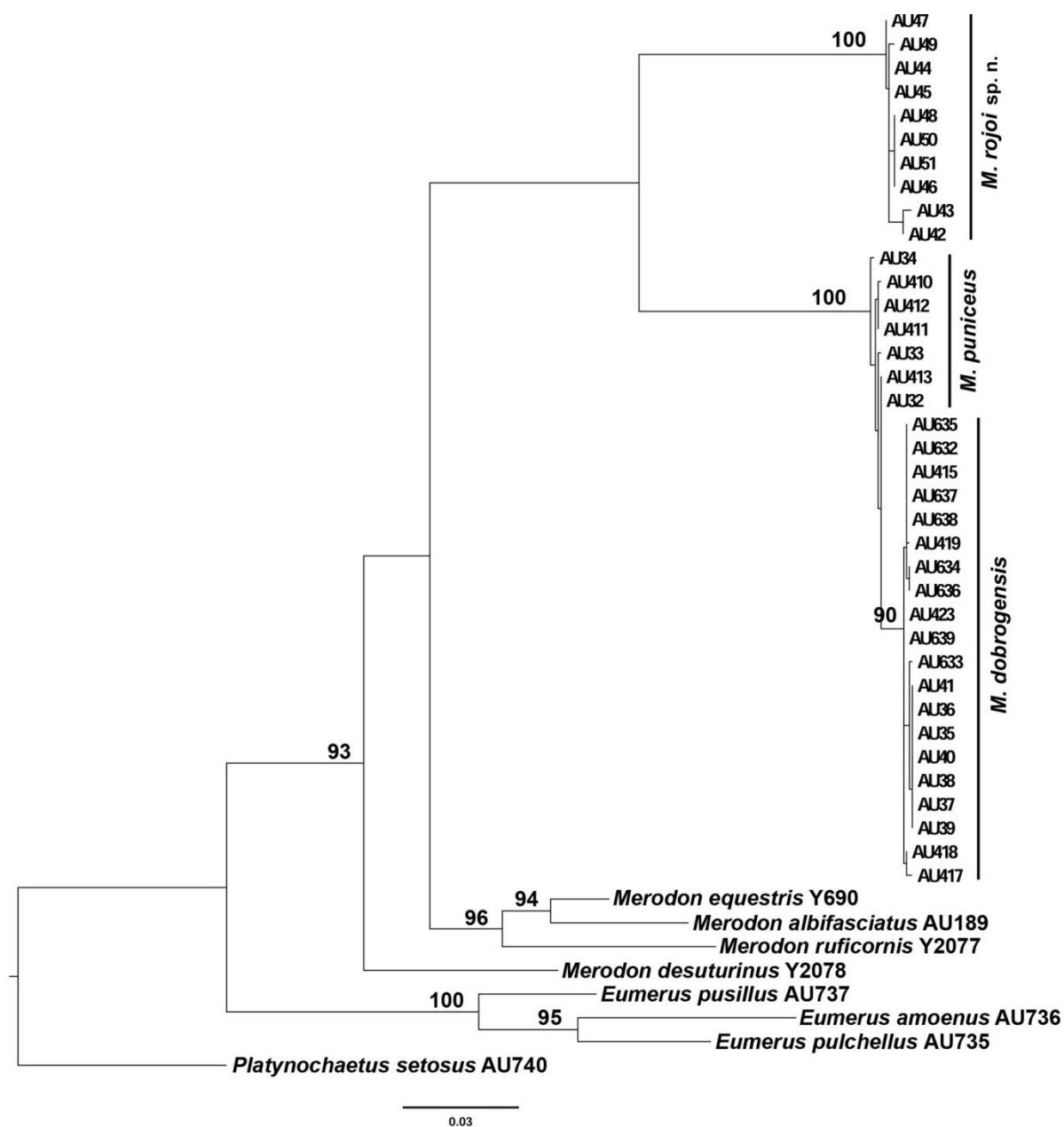
Табела 38. Некориговане просечне вредности дистанци (*p* - *uncorrected pairwise distance*) између парова врста и/или потенцијалних врста *Merodon dobrogensis* подгрупе. / *Table 38. Uncorrected pairwise distances between species pairs within Merodon dobrogensis subgroup.*

	1.	2.	3.
1. <i>M. rojoi</i> sp. n.		0,008	0,008
2. <i>M. puniceus</i>	0,087		0,002
3. <i>M. dobrogensis</i>	0,088	0,008	

p дистанца - испод дијагонале; стандардно одступање - изнад дијагонале. / *p distance - below diagonal; standard deviation - above diagonal.*

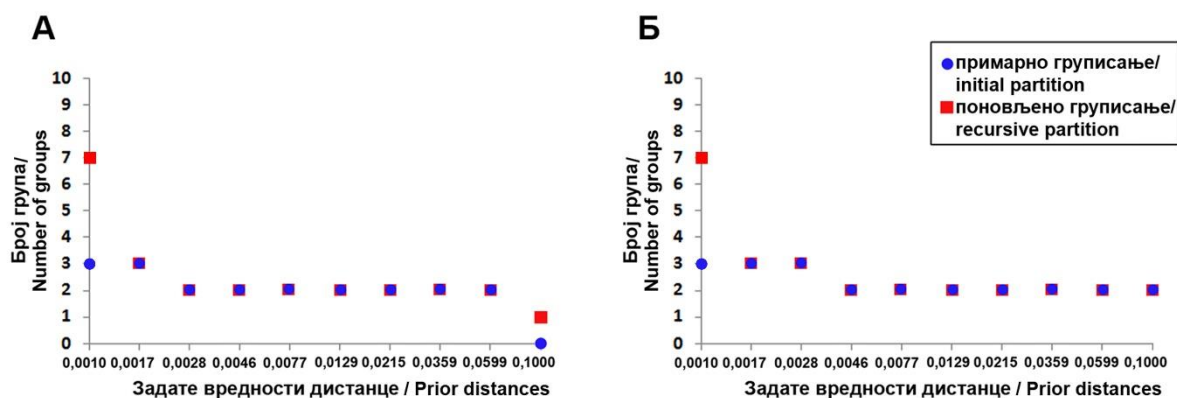


Слика 40. Стабло парсимоније *Merodon dobrogensis* подгрупе добијено анализом COI секвенци. Дужина: 715 корака, *Consistency index* (CI) 62, *Retention index* (RI) 87. *Bootstrap* вредности ≥ 50 приказане су изнад чворова. Испуњени кругови представљају карактере који нису хомоплазије, празни кругови представљају хомоплазије. / Figure 40. Maximum parsimony tree of *Merodon dobrogensis* subgroup constructed using COI sequences. Length: 715 steps, Consistency index (CI) 62, Retention index (RI) 87. The bootstrap values ≥ 50 are indicated near nodes. Filled circles represent non-homoplasious characters, open circles are homoplasious characters.



Слика 41. *Maximum-likelihood* COI стабло за *Merodon dobrogensis* подгрупу. *Bootstrap* вредности ≥ 50 приказане су изнад чворова. / *Figure 41. Maximum-likelihood* COI tree of *Merodon dobrogensis* subgroup. The *bootstrap* values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.

Групе одређене АВГД анализом за задате вредности дистанце 0,0017 (p дистанце, K80) и 0,0017-0,0028 (T92+G, G=0,12) одговарају врстама *M. rojoi* sp. n., *M. puniceus* и *M. dobrogensis* (Сл. 42).



Слика 42. Утврђивање присуства баркод шупљине (енг. *barcoding gap*) применом задатог опсега вредности дистанци унутар *Merodon dobrogensis* подгрупе. А) некоригована р дистанца; Б) T92+G. / *Figure 42. Determination of barcoding gap presence by applying a given range of distance values within the Merodon dobrogensis subgroup. A) uncorrected p distance; Б) T92+G.*

Од укупно 1400 позиција анализираних COI секвенци 144 су варијабилне, а од тог броја 133 позиције су парсимонија информативне. Укупан број хаплотипова је 19, од чега 6 припада *M. rojoi* sp. n., 5 припада *M. puniceus* и 8 припада *M. dobrogensis* (Таб. 39 и 40). Диверзитет хаплотипова (Hd) комплекса износи 0,93694, просечан број нуклеотидних разлика (K) је 53,47147, а диверзитет нуклеотида (Pi) је 0,03819 (Таб. 39).

Табела 39. Параметри генетичког полиморфизма за *Merodon dobrogensis* подгрупу. / *Table 39. Parameters of genetic polymorphism of Merodon dobrogensis subgroup.*

	N	S	h	Hd	K	Pi
<i>M. rojoi</i> sp. n.	10	13	6	0,84444	4,04444	0,00289
<i>M. puniceus</i>	7	8	5	0,90476	3,04762	0,00218
<i>M. dobrogensis</i>	20	10	8	0,82632	2,77368	0,00198
<i>M. dobrogensis</i> подгрупа	37	144	19	0,93694	53,47147	0,03819

N - број секвенци / *number of sequences*; S - број полиморфних позиција / *number of polymorphic sites*; h - број хаплотипова / *number of haplotypes*; Hd - диверзитет хаплотипова / *haplotype diversity*; K - просечан број нуклеотидних разлика / *average number of nucleotide differences*; Pi - диверзитет нуклеотида / *nucleotide diversity*.

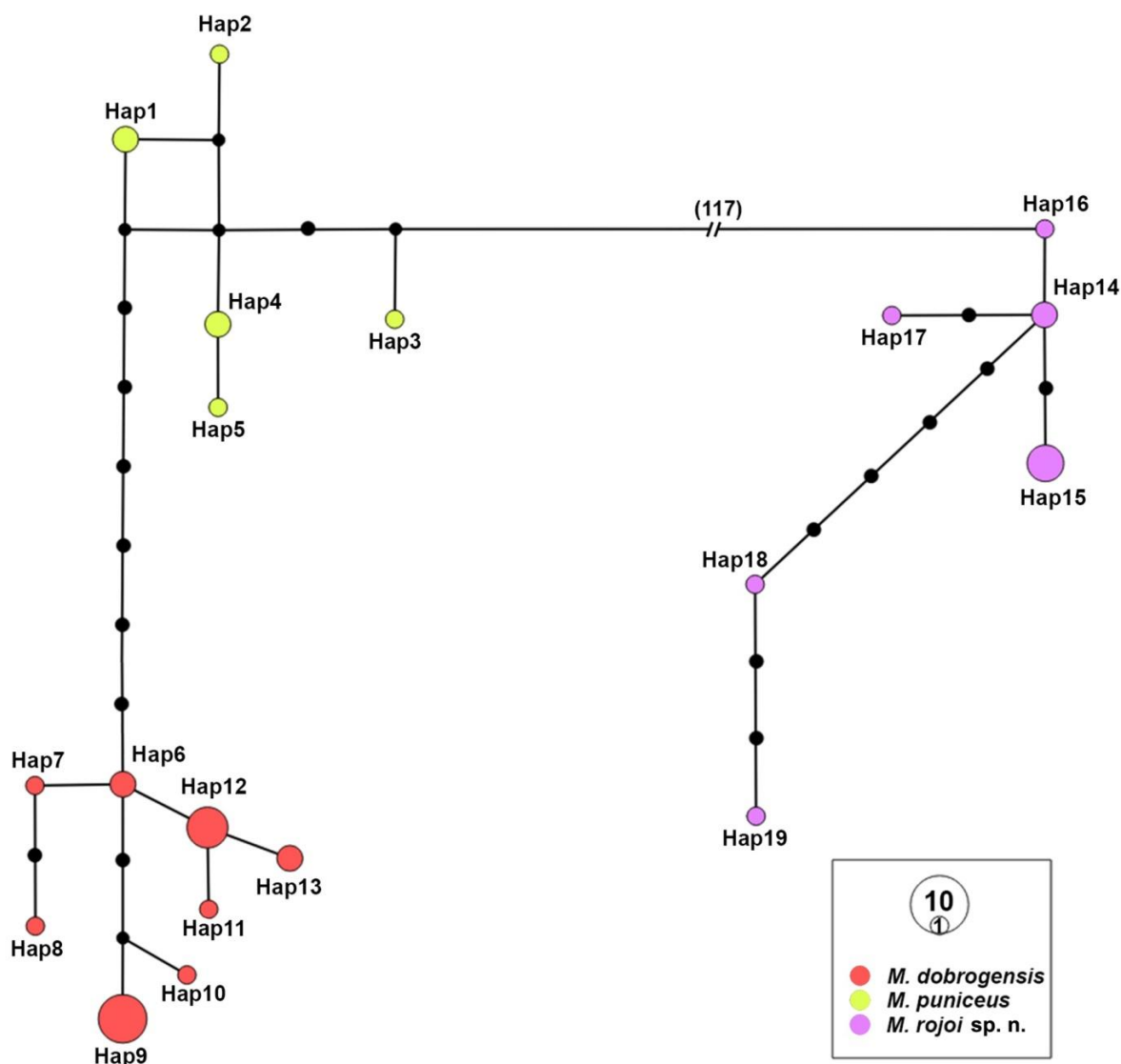
M. rojoi sp. n. хаплотипска група је на *Median-joining* мрежа COI хаплотипова одвојена са 117 мутационих корака од друге две врсте *M. dobrogensis* подгрупе. Унутар ове групе уочљиве су две подгрупе, прва која обухвата хаплотипове присутне на Пелопонезу (Hap14-Hap17) и друга која обухвата хаплотипове континенталног дела



Грчке (Hap18 и Hap19). Хаплотипске групе које одговарају *M. dobrogensis* и *M. puniceus* раздвојене су са 7 мутационих корака (Сл. 43).

Табела 40. Преглед хаплотипова комбинованих секвенци 3' и 5' крај COI гена за *Merodon dobrogensis* подгрупе. / Table 40. List of combined 3' and 5' ends COI sequence haplotypes of *Merodon dobrogensis* subgroup.

COI хаплотипови [ДНК кодови] / COI haplotypes [DNA codes]	
<i>M. rojoi</i> sp. n.	Hap14 [AU44 AU45], Hap15 [AU46 AU48 AU50 AU51], Hap16 [AU47], Hap17 [AU49], Hap18 [AU42], Hap19 [AU43]
<i>M. puniceus</i>	Hap1 [AU32 AU413], Hap2 [AU33], Hap3 [AU34], Hap4 [AU411 AU412], Hap5 [AU410]
<i>M. dobrogensis</i>	Hap6 [AU423 AU639], Hap7 [AU418], Hap8 [AU417], Hap9 [AU35 AU36 AU37 AU38 AU39 AU40 AU41], Hap10 [AU633], Hap11 [AU419], Hap12 [AU415 AU632 AU635 AU637 AU638], Hap13 [AU634 AU636]



Слика 43. Median-joining мрежа COI хаплотипова *Merodon dobrogensis* подгрупе. / Figure 43. Median-joining network of COI haplotypes of *Merodon dobrogensis* subgroup.



АМОВА анализом тестирана је генетичка структурираност показана у филогенетским анализама и конструкцијом мреже хаплотипова. Вредност индекса фиксације F_{ST} између врста је 0,96279. Поређењем парова популација добијене су F_{ST} вредности у опсегу од 0,74597 (*M. puniceus* и *M. dobrogensis*) до 0,97425 (*M. rojoi* sp. n. и *M. dobrogensis*). Све вредности F_{ST} су статистички значајне (ниво значајности $p \leq 0,05$) (Таб. 41).

Табела 41. Вредности индекса фиксације (F_{ST}) између парова врста *Merodon dobrogensis* подгрупе. / Table 41. The values of fixation index between species pairs within *Merodon dobrogensis* subgroup.

	1.	2.	3.
1. <i>M. rojoi</i> sp. n.		*	*
2. <i>M. puniceus</i>	0,97005		*
3. <i>M. dobrogensis</i>	0,97425	0,74597	

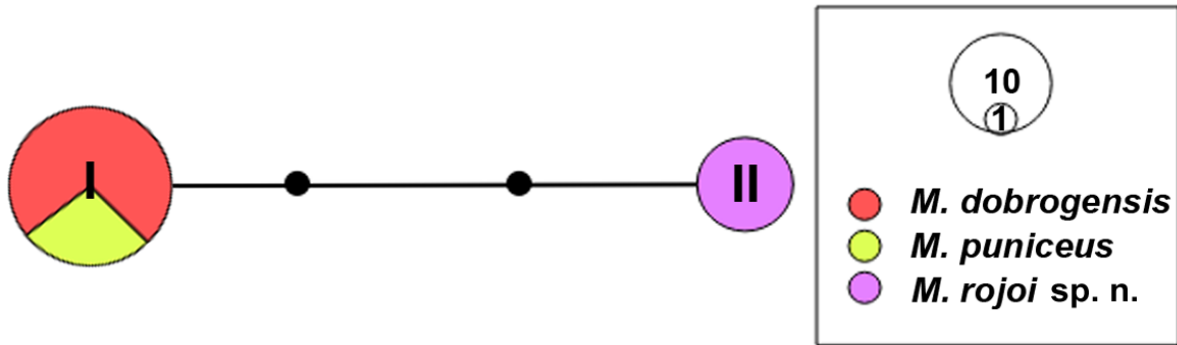
*ниво значајности $p \leq 0,05$ / significance level: $p \leq 0,05$

Анализа 28S рРНК гена за *M. dobrogensis* подгрупу укључивала је 35 секвенци. Дужина секвенци креће се од 578 - 579 бр, док је дужина поравнатих секвенци 579 бр.

Укупан број варијабилних позиција је 3 и све су парсимонија информативне. Дефинисана су 2 генотипа (Сл. 44, Таб. 42), а диверзитет генотипова (Gd) је 0,393. Диверзитет нуклеотида (Pi) је 0,00204. Генотип I дељен је између врста *M. dobrogensis* и *M. puniceus*, док је генотип II јединствен за *M. rojoi* sp. n. и одваја се са 3 мутациона корака од генотипа I (Сл. 44).

Табела 42. Преглед генотипова 28S рДНК за *Merodon dobrogensis* подгрупу. / Table 42. List of 28S genotypes of *Merodon dobrogensis* subgroup.

28S генотипови / 28S genotypes	ДНК кодови / DNA codes	
I	AU35 AU36 AU37 AU38 AU39 AU40 AU41 AU415 AU417 AU418 AU419 AU423 AU632 AU633 AU634 AU635 AU636 AU637 AU638 AU639	<i>M. dobrogensis</i>
	AU32 AU33 AU34 AU410 AU411 AU412 AU413	<i>M. puniceus</i>
II	AU42 AU43 AU44 AU45 AU46 AU47 AU48 AU49 AU50 AU51	<i>M. rojoi</i> sp. n.



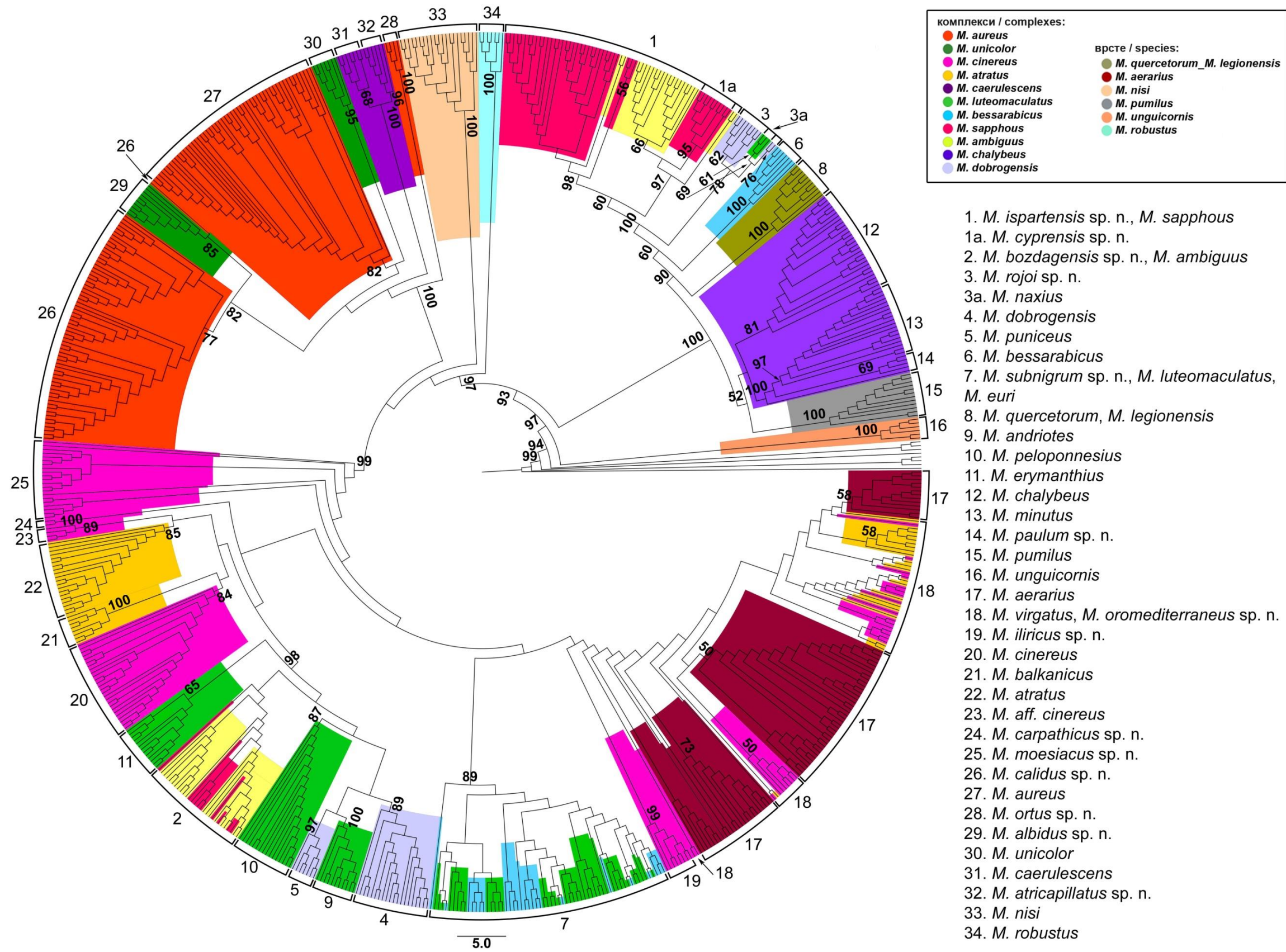
Слика 44. *Median-joining* мрежа 28S генотипова *Merodon dobrogensis* подгрупе. / *Figure 44. Median-joining network of 28S genotypes of Merodon chalybeus complex.*



6.7. Диверзитет *Merodon aureus* групе

Конструисано је COI ML стабло за све анализиране јединке *Merodon aureus* групе. Анализа је укључила 718 комбинованих (3' и 5') COI секвенци, дужине 1260bp. Укупно је дефинисано 27 монофилетских клада које одговарају претходно описаним и/или новооткривеним врстама. Од ових, 4 кладе имају *bootstrap* подршку у опсегу 60-80 (*M. calidus* sp. n., *M. caeruleascens*, *M. erymanthius*, *M. naxius*), 8 у опсегу 81-94 (*M. aureus*, *M. albidus* sp. n., *M. atratus*, *M. cinereus*, *M. aff. cinereus*, *M. peloponnesius*, *M. chalybeus*, *M. dobrogensis*), а 15 у опсегу 95-100 (*M. cyprensis* sp. n., *M. bessarabicus*, *M. andriotes*, *M. minutus*, *M. pumilus*, *M. unguicornis*, *M. iliricus* sp. n., *M. balkanicus*, *M. carpathicus* sp. n., *M. ortus* sp. n., *M. unicolor*, *M. atricapillatus* sp. n., *M. nisi*, *M. robustus*, *M. puniceus*). Врсте *M. quercetorum* и *M. legionensis* су разрешене као једна клада са *bootstrap* подршком од 100. Од 11 морфолошки дефинисаних комплекса, два су дефинисана као монофилетска: *M. chalybeus* комплекс и *M. caeruleascens* комплекс. Врсте *M. aerarius*, *M. virgatus* (*M. atratus* комплекс), *M. oromediterraneus* sp. n. (*M. cinereus* комплекс) чине један кластер. Такође, *M. ispartensis* sp. n. (*M. ambiguus* комплекс), *M. sapphous* и *M. cyprensis* sp. n. (обе из *M. sapphous* комплекса) чине један кластер, али је врста *M. cyprensis* sp. n. монофилетска клада са *bootstrap* подршком од 95. *M. bozdagensis* sp. n. (*M. sapphous* комплекс) и *M. ambiguus* (*M. ambiguus* комплекс) нису разрешене у посебним кладама, а слично је и са *M. subnigrum* sp. n. (*M. bessarabicus* комплекс), *M. luteomaculatus* и *M. euri* (*M. luteomaculatus* комплекс) (Сл. 45).

Додатно, ML анализа за целу *Merodon aureus* групу примењена је на комбинованом сету секвенци COI+28S. Укупно су анализиране 664 комбиноване секвенце, а дужина секвенци након поравнања износила је 1845bp. Дефинисана је 32 монофилетска клада. 11 монофилетских клада подржано је са *bootstrap* вредностима 50-80 (*M. aureus*, *M. calidus* sp. n., *M. albidus* sp. n., *M. caeruleascens*, *M. atratus*, *M. luteomaculatus*, *M. naxius*, *M. erymanthius*, *M. sapphous*, *M. cyprensis* sp. n., *M. rojoi* sp. n.), 6 са 81-94 (*M. atricapillatus* sp. n., *M. cinereus*, *M. aff. cinereus*, *M. moesiacus* sp. n., *M. chalybeus*, *M. dobrogensis*), 14 са 95-100 (*M. ortus* sp. n., *M. unicolor*, *M. carpathicus* sp. n., *M. iliricus* sp. n., *M. balkanicus*, *M. bessarabicus*, *M. peloponnesius*, *M. andriotes*, *M. nisi*, *M. minutus*, *M. puniceus*, *M. robustus*, *M. pumilus*, *M. unguicornis*), док је за једну (*M. euri*) *bootstrap* подршка испод 50. Монофилетске кладе одговарају претходно описаним и/или новооткривеним врстама *M. aureus* групе. Врсте *M. quercetorum* и *M. legionensis*

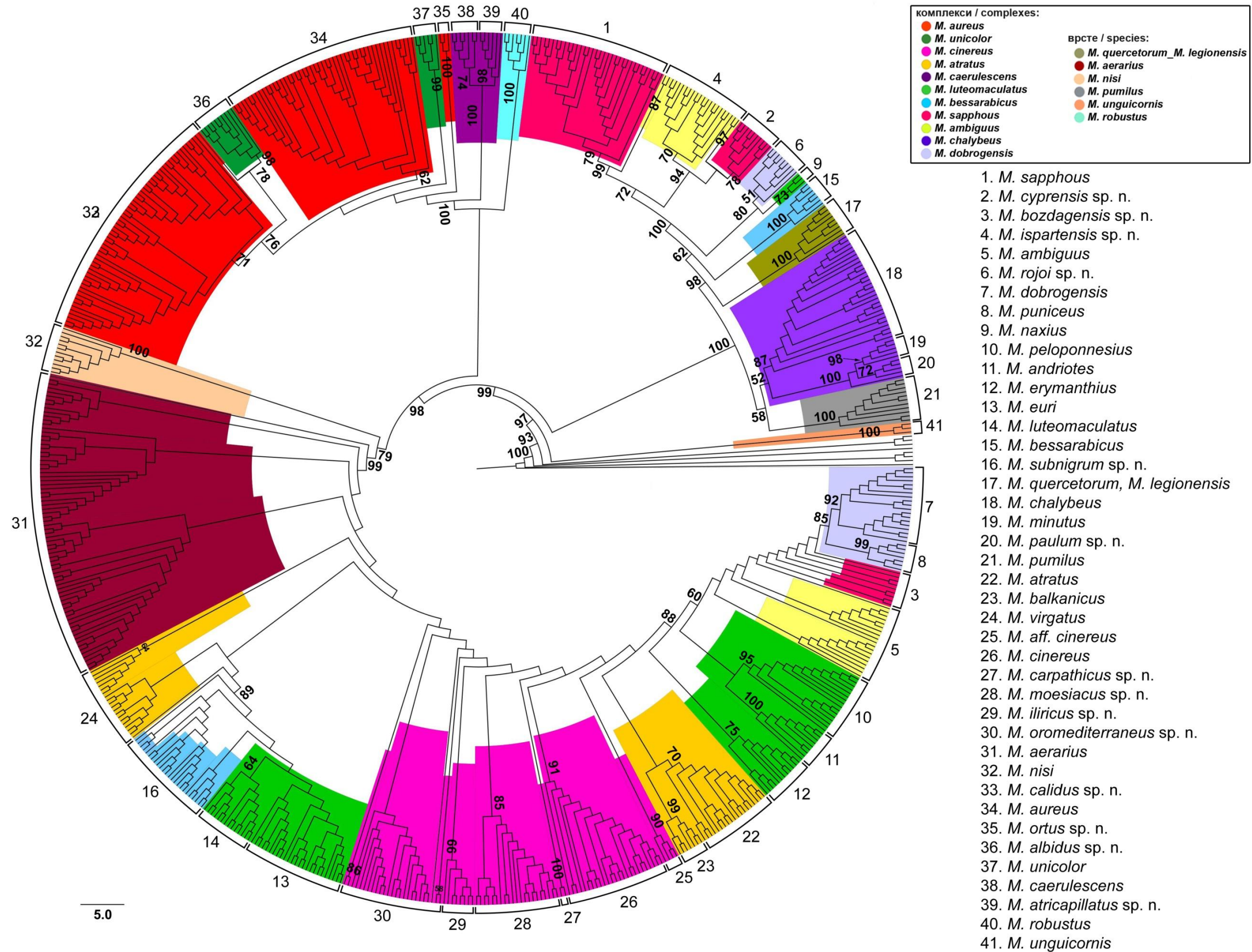


Слика 45. Maximum-likelihood COI стабло за *Merodon aureus* групу. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / Figure 45. Maximum-likelihood COI tree of *Merodon aureus* group. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.

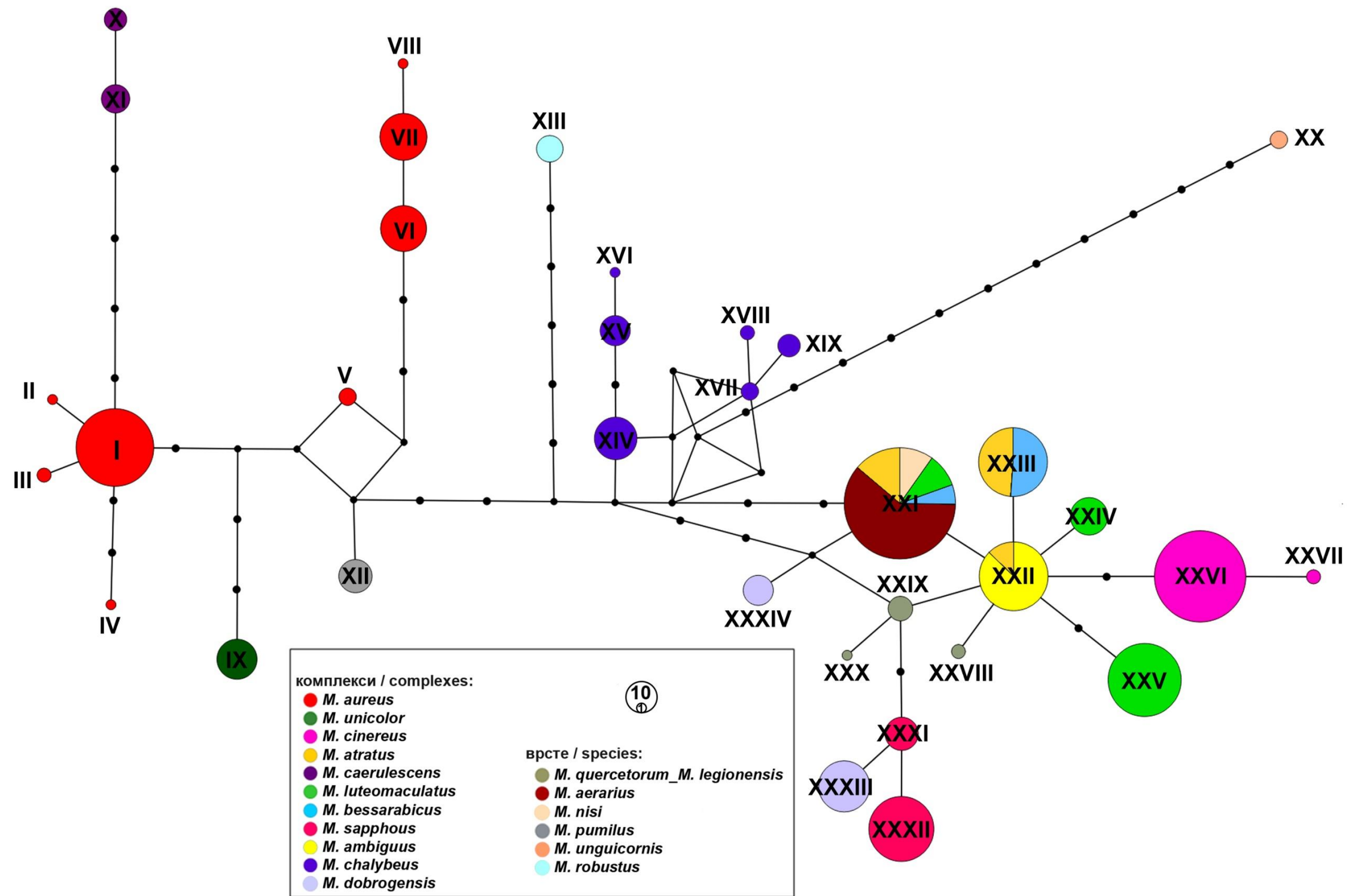


су разрешене као једна клада са *bootstrap* подршком од 100. Врсте *M. bozdagensis* sp. n., *M. ambiguus*, *M. ispartensis* sp. n., *M. subnigrum* sp. n., *M. aerarius*, *M. oromediterraneus* sp. n. и *M. virgatus* нису разрешене као монофилетске. *M. chalybeus* комплекс и *M. caerulescens* комплекс су монофилетски (*bootstrap* вредност 52 и 100) (Сл. 46).

28S секвенце (665 секвенци, дужина поравнатог сета је 555bp) за целу *Merodon aureus* групу анализирани су засебно конструкцијом *Median-joining* мрежа 28S генотипова. На мрежи је могуће уочити две главне генотипске групе. Прву чине генотипови *M. aureus* комплекса, *M. unicolor* комплекса, *M. caerulescens* комплекса и *M. pumilus*, а другу генотипови *M. atratus* комплекса, *M. cinereus* комплекса, *M. bessarabicus* комплекса, *M. sapphous* комплекса, *M. ambiguus* комплекса, *M. luteomaculatus* комплекса, *M. dobrogensis* комплекса, *M. quercetorum*, *M. legionensis*, *M. nisi* и *M. aerarius*. Ове две генотипске групе одвојене су са 7 мутационих корака. Генотипови *M. chalybeus* комплекса (XIV - XIX) позиционирани су између поменуте две главне групе. Генотипови XIII и XX, који одговарају *M. robustus* и *M. unguicornis* су издвојени у односу на поменуте групе. *M. robustus* је удаљен 9 мутационих корака од прве генотипске групе и 8 мутационих корака од генотипова *M. chalybeus* комплекса. *M. unguicornis* је удаљен 12 мутационих корака од генотипова *M. chalybeus* комплекса и 16 мутационих корака од друге главне генотипске групе (Сл. 47). Сви 28S генотипови *M. aureus* комплекса, *M. unicolor* комплекса, *M. caerulescens* комплекса, *M. cinereus* комплекса, *M. sapphous* комплекса, *M. chalybeus* комплекса, *M. dobrogensis* комплекса, *M. pumilus*, *M. robustus* и *M. unguicornis* су јединствени за комплекс/врсту. Генотип XXI је заједнички за *M. atratus* комплекс, *M. luteomaculatus* комплекс, *M. bessarabicus* комплекс, *M. aerarius* и *M. nisi*. *M. atratus* комплекс и *M. ambiguus* комплекс деле генотип XXII, док *M. atratus* и *M. bessarabicus* деле генотип XXIII (Сл. 47, Таб. П2 у Прилогу 4).



Слика 46. Maximum-likelihood COI+28S стабло за *Merodon aureus* групу. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / Figure 46. Maximum-likelihood COI+28S tree of *Merodon aureus* group. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.

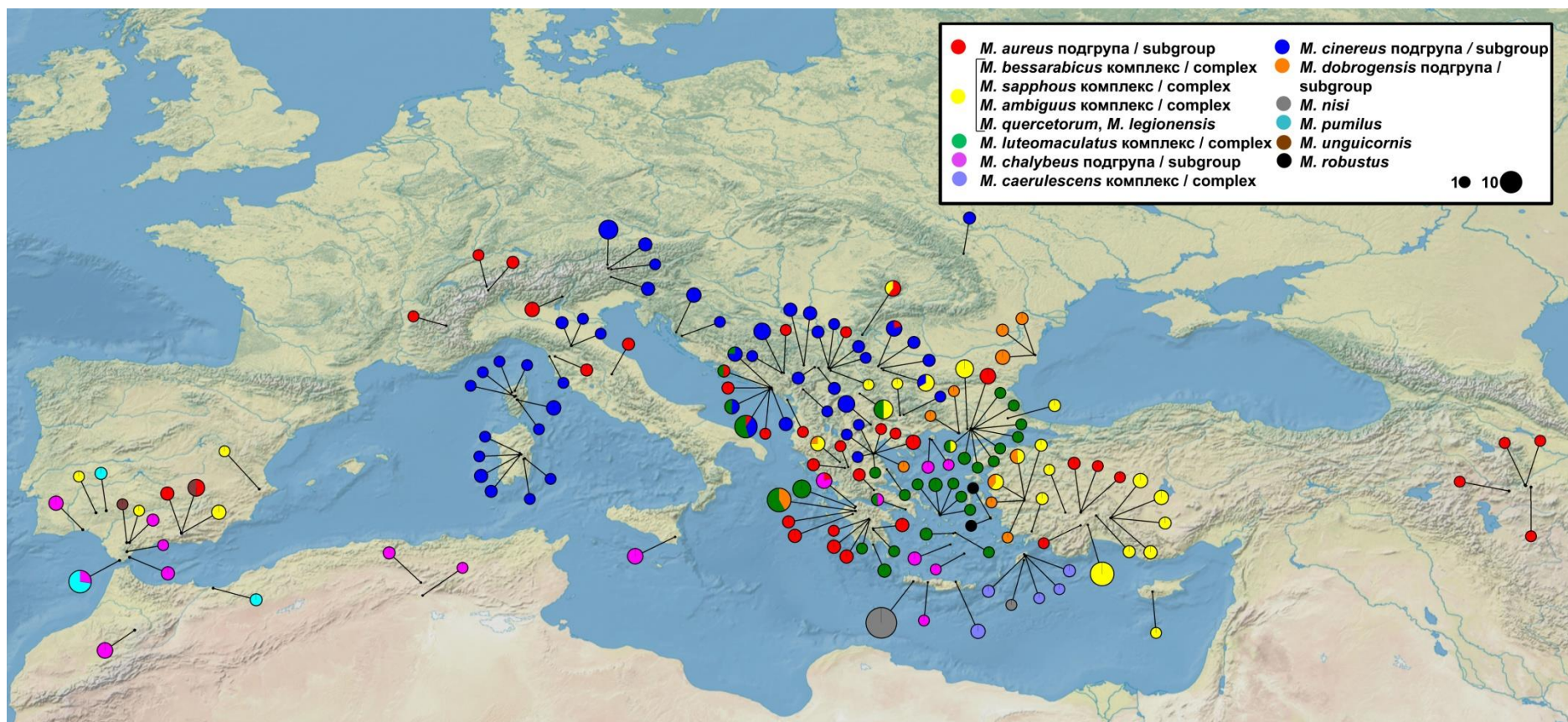


Слика 47. Median-joining мрежа 28S генотипова *Merodon aureus* групе. / Figure 47. Median-joining network of 28S genotypes of *Merodon aureus* group.



6.8. Дистрибуција COI хаплотипова *Merodon aureus* групе

Мапа дистрибуције *Merodon aureus* групе конструисана је на основу података о локалитетима узорковања јединки укључених у генетичку анализу, броја различитих хаплотипова нађених на сваком појединачном локалитету и припадности хаплотипова одговарајућој подгрупи, комплексу и/или врсти (Сл. 48). Укупан број хаплотипова за сет секвенци целе *Merodon aureus* групе (718 комбинованих COI секвенци, дужине 1260bp) је 303 (Hd=0,9917). Укупно је означено 164 локалитета (Сл. 48) од чега 15 у Србији, 2 у Хрватској, 2 у Бугарској, 1 у Македонији, 4 у Румунији, 12 у Црној Гори, 61 у Грчкој, 18 у Турској, 4 у Ирану, 1 на Кипру, 7 у Француској, 2 у Швајцарској, 4 у Аустрији, 14 у Италији, 13 у Шпанији и 4 у Мароку. Највећи број локалитета је у области која обухвата Балканско полуострво, острва Егејског мора и западни и југозападни део Мале Азије, где су присутни представници свих подгрупа *M. aureus* групе. На Иберијском полуострву детектовани су представници *M. aureus* погрупе, *M. bessarabicus* подгрупе, *M. chalybeus* подгрупе и врсте *M. unguicornis* и *M. pumilus*. На Алпима и Апенинском полуострву детектовани су представници *M. aureus* погрупе и *M. cinereus* подгрупе. На острвима Корзика и Сардинија нађена је врста *M. aerarius* из *M. cinereus* подгрупе, а на Сицилији *M. chalybeus* из *M. chalybeus* подгрупе. *M. ortus* (*M. aureus* подгрупа) је нађен само у Ирану. У Мароку су забележене врсте *M. chalybeus* и *M. pumilus* (Сл. 48, Таб. П1 у Прилогу 4). На територији Балканског полуострва присутно је 17 врста *M. aureus* групе (*M. aureus*, *M. calidus* sp. n., *M. iliricus* sp. n., *M. moesiacus* sp. n., *M. oromediterraneus* sp. n., *M. balkanicus*, *M. virgatus*, *M. aerarius*, *M. luteomaculatus*, *M. euri*, *M. peloponnesius*, *M. erymanthius*, *M. ambiguus*, *M. subnigrum* sp. n., *M. minutus*, *M. dobrogensis*, *M. rojoi* sp. n.). Локалитет са највећим бројем COI хаплотипова је локалитет „Грчка 10” (Таб. П1 у Прилогу 1) на острву Крит (Сл. 48), док је држава са највећим бројем COI хаплотипова (111), као и највећим бројем врста *M. aureus* групе (16) Грчка (Таб. П1 у Прилогу 4).



Слика 48. Мапа дистрибуције *Merodon aureus* групе кроз области узорковања. Величина питичастих графика одговара броју различитих хаплотипова, црне линије повезују графике са локалитетима, док боја указује на припадност подгрупи, комплексу или врсти. / Figure 48. The distribution map of *Merodon aureus* group through the sampling areas. The size of pie graphs corresponds to number of different haplotypes, black lines connect the pie graphs with localities, while colour depicts subgroups, complexes or species.



6.9. Детекција присуства бактерија из рода *Wolbachia* у *Merodon aureus* групи

Тестирање на присуство *Wolbachia* укључивало је 45 јединки припадника 41 различите врсте *Merodon aureus* групе. Укупно је продуковано 42 секвенце 16S рРНК гена бактерије и 35 секвенци *wsp* гена. Дужина срањених секвенци 16S рРНК гена износила је 412bp, секвенце су биле без празних позиција (енг. *gap*), док је секвенца AU360 била нешто краћа (333bp). Након додатка секвенци из Банке Гена (GenBank) и аутгрупа срањена матрица секвенци укључивао је 63 узорка, а дужина сета је била 415bp. Срањене секвенце *wsp* гена садржале су празне позиције (енг. *gap*), укупна дужина након срањивања секвенци износила је 560bp. BLAST-овањем у NCBI и поређења са MLST *Wolbachia* базом потврђено је да секвенце припадају *Wolbachia*.

Анализа бактеријске 16S рРНК дала је позитиван резултат код 38 врста, док су *Merodon cyprensis* sp. n. (*M. sapphous* комплекс), *M. ortus* sp. n. (*M. aureus* комплекс) и *M. balkanicus* (*M. atratus* комплекс) биле негативне на присуство *Wolbachia*. На основу 16S ML стабла потврђено је да су врсте *M. aureus* групе заражене А супергрупом *Wolbachia* (Сл. 49).

Тестирањем *wsp* гена потврђено је присуство *Wolbachia* код 32 врсте, међу којима су *Merodon cyprensis* sp. n. и *M. ortus* sp. n. За *M. nisi* није добијен продукт након реакције умножавања *wsp* гена, а за *M. naxius*, *M. andriotes* (обе из *M. luteomaculatus* комплекса) и *M. puniceus* (*M. dobrogensis* комплекс) су добијени мултипли продукти различитих дужина. Секвенце *wsp* гена врста *M. albidus* sp. n. (*M. unicolor* комплекс), *M. cinereus* (*M. cinereus* комплекс), *M. aerarius* и *M. pumilus* су биле лошег квалитета и нису коришћене у даљој анализи. Од свих тестираних јединки одсуство продуката умножавања *Wolbachia* гена забележено је само код представника врсте *M. balkanicus* (*M. atratus* комплекс) (Таб. 43). Укупно је дефинисано седам хаплотипова *wsp* гена (Сл. 50). Нар1 је најзаступљенији, док је Нар5 присутан само код врсте *M. bessarabicus*.



Табела 43. Резултати тестирања на *Wolbachia* јединки припадника различитих врста *Merodon aureus* групе. / Table 43. The *Wolbachia* screening results of specimens which belong to different *Merodon aureus* group species.

Код / ID	ДНК код / DNA ID	Врста / Species	Комплекс / Complex	Подгрупа / Subgroup	16S	wsp	
08638	AU402	<i>M. naxius</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>bessarabicus</i>	+	*	
G2430	AU497	<i>M. erymanthius</i>			+	A	
R85	AU812	<i>M. luteomaculatus</i>			+	A	
AC57	AU27	<i>M. austerus</i>			+	A	
08607	AU396	<i>M. peloponnesius</i>			+	AB	
G2465	AU504	<i>M. andriotes</i>			+	*	
08032	AU443	<i>M. sapphous</i>	<i>sapphous</i>		+	AB	
AJ9	AU99	<i>M. bozdagensis</i> sp. n.			+	A	
05272	AU141	<i>M. cyprensis</i> sp. n.	<i>bessarabicus</i>		-	A	
08485	AU454	<i>M. bessarabicus</i>			+	AB	
G2412	AU82	<i>M. subnigrum</i> sp. n.	<i>ambiguus</i>		+	A	
G2320	AU53	<i>M. ambiguus</i>			+	A	
08084	AU474	<i>M. ispartensis</i> sp. n.			+	A	
10743	AU1435	<i>M. quercetorum</i>			+	A	
10750	AU1442	<i>M. legionensis</i>		+	A		
10701	AU1432	<i>M. nisi</i>		+	-		
07274	AU321	<i>M. unicolor</i>		<i>unicolor</i>	+	AB	
09933	AU796	<i>M. albidus</i> sp. n.	+		**		
T84	AU710	<i>M. aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	+	AB	
06580	AU723	<i>M. calidus</i> sp. n.			+	A	
A81	AU701	<i>M. calidus</i> sp. n.			+	A	
10288	AU485	<i>M. ortus</i> sp. n.			-	A	
M30	AU360	<i>M. cinereus</i>			+	**	
M34	AU1371	<i>M. aff. cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	+	AB	
G1873	AU530	<i>M. moesiacus</i> sp. n.			+	A	
12354	AU1362	<i>M. iliricus</i> sp. n.			+	A	
O69	AU236	<i>M. oromediterraneus</i> sp. n.			+	A	
13487	AU1443	<i>M. carpathicus</i> sp. n.			+	A	
N43	AU517	<i>M. atratus</i>			<i>atratus</i>	+	A
M8	AU151	<i>M. balkanicus</i>	-			-	
M76	AU144	<i>M. virgatus</i>	+			A	
07765	AU550	<i>M. virgatus</i>	+			A	
AE56	AU874	<i>M. aerarius</i>	+			**	
07006	AU311	<i>M. minutus</i>	<i>chalybeus</i>		<i>chalybeus</i>	+	A
09370	AU752	<i>M. chalybeus</i>				+	A
T15	AU36	<i>M. dobrogensis</i> G	<i>dobrogensis</i>		<i>dobrogen sis</i>	+	A
08512	AU632	<i>M. dobrogensis</i> R				+	A
08682	AU413	<i>M. puniceus</i>		+		*	
G2380	AU47	<i>M. rojoi</i> sp. n.		+		A	



06376	AU176	<i>M. atricapillatus</i> sp. n.	<i>caerulescens</i>		+	A
T62	AU107	<i>M. caerulescens</i>			+	A
09364	AU742	<i>M. pumilus</i> S			+	**
Đ22	AU253	<i>M. pumilus</i> M			+	**
F62	AU115	<i>M. robustus</i>			+	A
07291	AU326	<i>M. unguicornis</i>			+	AB

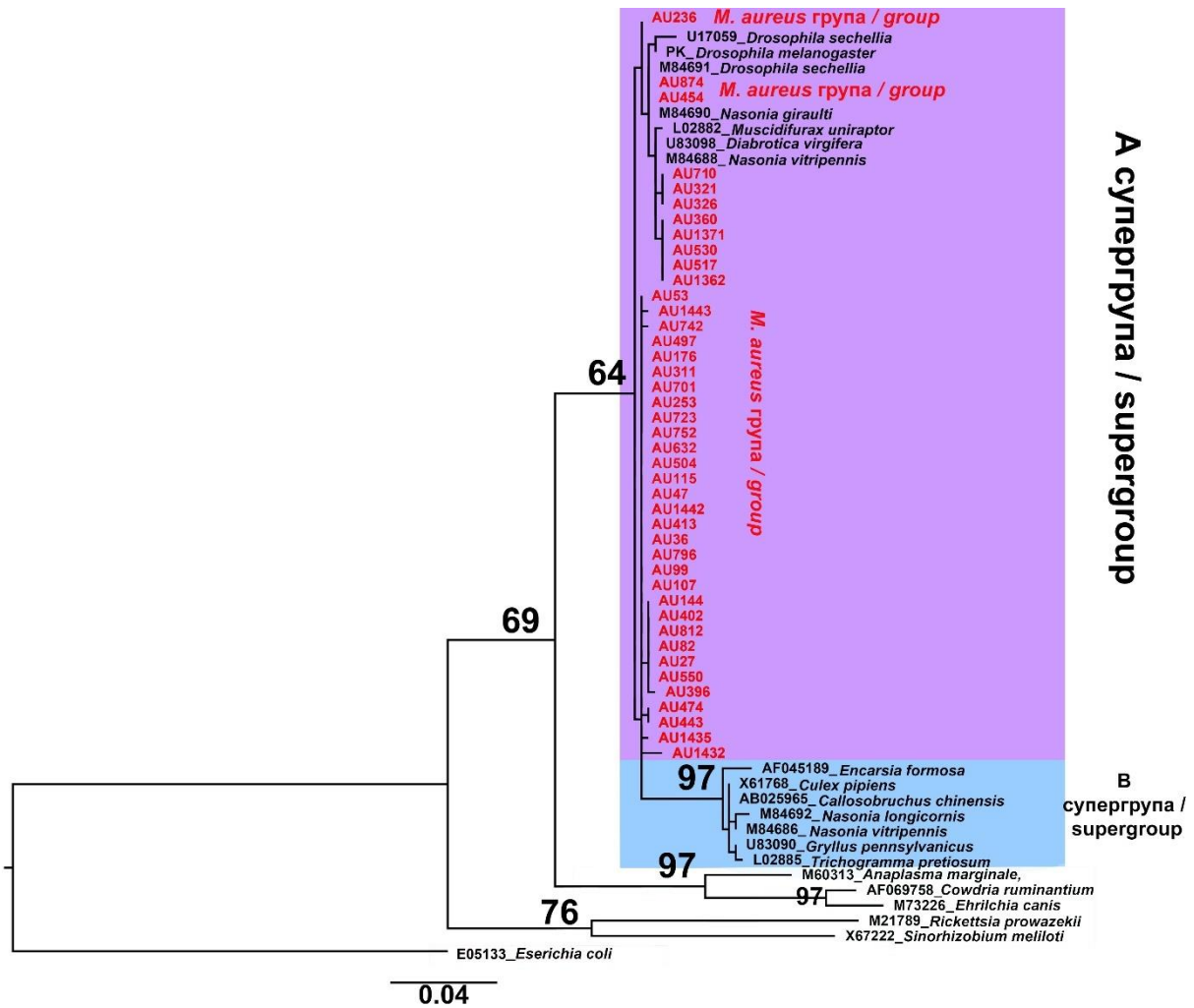
A - wsp умножен применом пара прајмера 136F/691R специфичних за супергрупу A / A - *wsp amplified using 136F/691R primer pair specific for supergroup A*;

B - wsp умножен применом пара прајмера 81F/522R специфичних за супергрупу B / B - *wsp amplified using 81F/522R primer pair specific for supergroup B*;

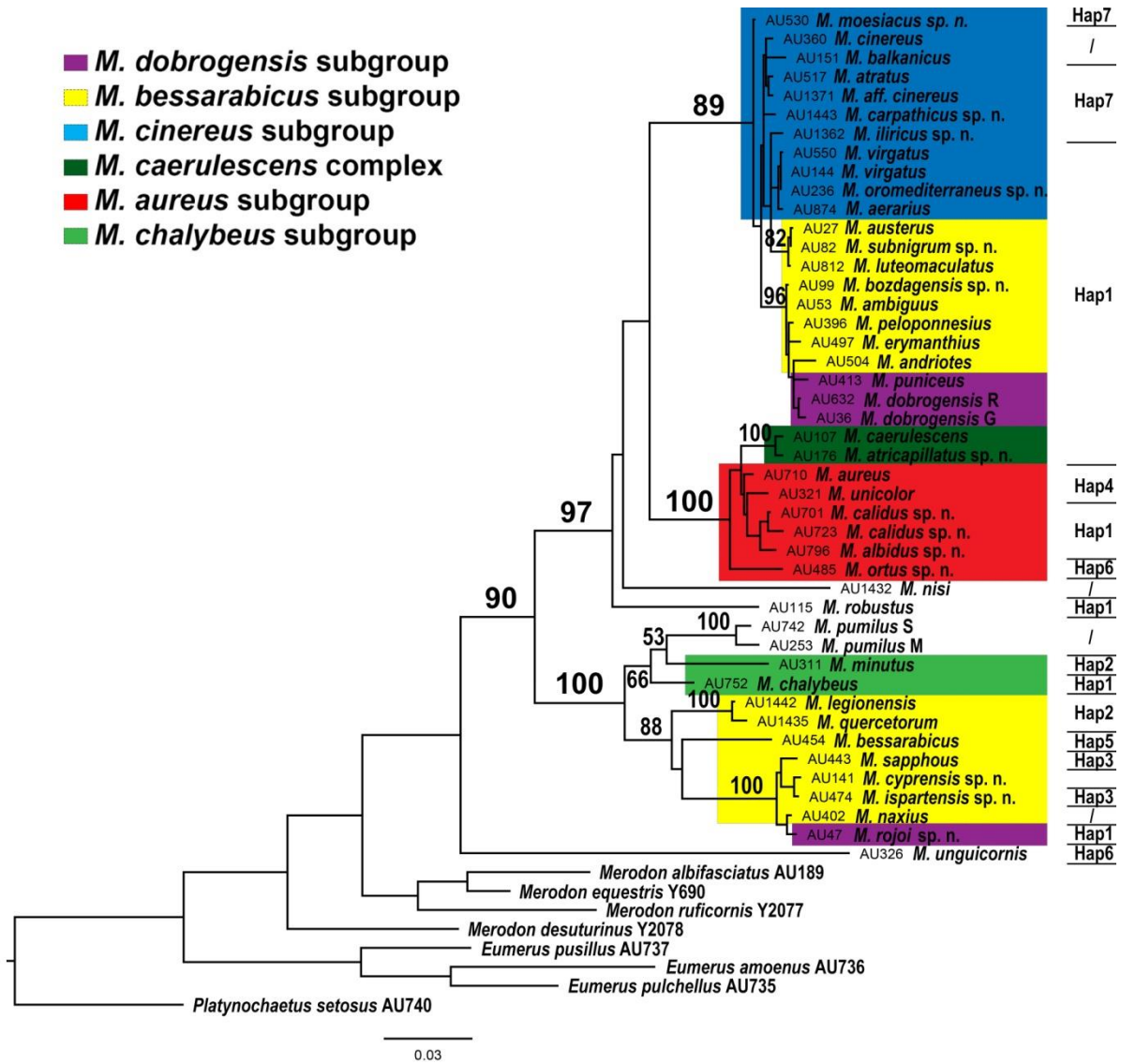
AB- wsp умножен применом универзалног пара прајмера 81F/691R / AB - *wsp amplified using 81F/691R universal primer pair*;

*- мултипли продукти детектовани електрофорезом / *- *multiple products detected using electrophoresis*;

** - секвенца лошег квалитета / **- *poor sequence quality*.



Слика 49. Maximum-likelihood стабло 16S рНК гена *Wolbachia* сојева присутних код врста *Merodon aureus* групе. / Figure 49. Maximum-likelihood tree based on 16S sequences of *Wolbachia* strains present in *Merodon aureus* species group.



Слика 50. *Maximum-likelihood* стабло *Merodon aureus* групе добијено анализом COI секвенци 1-2 представника сваке врсте; са означеним *wsp* хаплотипом *Wolbachia*. / *Figure 50. Maximum-likelihood tree of Merodon aureus species group produced using COI sequences of 1-2 specimens for each species; with marked Wolbachia wsp haplotypes.*



7. Дискусија

7.1. Процена молекуларног диверзитета *Merodon aureus* групе

У циљу одређивања молекуларног диверзитета *Merodon aureus* групе формирана је база секвенци COI гена и 28S рРНК гена. Секвенце су анализирани у циљу утврђивања генетичке варијабилности и могућности примене у молекуларној таксономији групе. Додатно, на једном од комплекса врста (*M. luteomaculatus* комплексу) тестирана је примена ISSR маркера.

Обрада секвенци, тј. анализа хроматограма и кориговање секвенци резултовали су матрицама секвенци различитих дужина. Разлике су последица исецања почетног и завршног дела сваке секвенце због лошег квалитета израженог у неправилним пиковима на хроматограму и неочитаним базама. Лош квалитет на почетку и на крају читавања је последица несавршености процедуре секвенционирања. Како су секвенце продуковане само у *forward* смеру (5'→3') није било могуће кориговати читавање поређењем са комплментарном секвенцом (синтетисана у *reverse* смеру, 3'→5'). Ово је додатно утицало на дужине крајњих матрица секвенци. Како се квалитет секвенци разликовао између подгрупа/комплекса врста тако је варијирала и дужина крајњих матрица секвенци коришћених у даљој анализи. Додатно, 28S секвенце могу да се разликују у дужини између различитих врста те су матрице 28S секвенци у неким случајевима садржале регионе празних позиција (енг. *gap*) што је такође имало утицај на дужину крајњих матрица.

Вредности диверзитета хаплотипова (Hd) COI гена углавном су биле високе у анализираним подгрупама/комплексима (*Merodon aureus* подгрупа - 0,95769; *M. caerulescens* комплекс - 0,94872; *M. cinereus* комплекс - 0,90029; *M. atratus* комплекс - 0,83759; *M. luteomaculatus* комплекс - 0,95886; *M. bessarabicus*/*M. sapphous*/*M. ambiguus* комплекс - 0,96939; *M. chalybeus* комплекс - 0,97059; *M. dobrogensis* комплекс - 0,93694). На нивоу врста међутим, *M. bessarabicus* и *M. carpathicus* sp. n. имале су само један COI хаплотип (Hd=0). У случају *M. carpathicus* sp. n. анализирани су само две секвенце и могуће је да би са укључивањем додатних секвенци број хаплотипова био већи. Врсте *M. paulum* sp. n., *M. naxius*, *M. legionensis* су имале Hd=1. Како диверзитет хаплотипова (Hd) представља вероватноћу да су две случајно узорковане секвенце различите (Nei, 1987), високе вредности овог параметра указују на високу варијабилност ДНК секвенце COI гена у различитим врстама, комплексима и/или



подгрупама. На нивоу групе анализом матрице 718 COI секвенци дужине 1260bp добијена је Hd вредност од 0,9917.

Конструкцијом MJ мреже COI хаплотипова показано је да врсте унутар комплекса немају заједничке хаплотипове. Међутим, у случају где су анализирана три комплекса заједно, *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* и *M. ambiguus* комплекси, утврђено је да врсте које припадају различитим комплексима могу да деле заједничке хаплотипове (*M. ambiguus* и *M. bozdagensis* sp. n.). Присуство заједничких хаплотипова може да укаже на интрогресију мтДНК, али може бити и последица манипулације мтДНК услед инфекције интраћелијским паразитима (видети део везан за *Wolbachia* инфекцију).

AMOVA анализом COI секвенци показано је да највећи део укупне варијабилности подгрупа/комплекса врста представља варијабилност између врста. Забележене F_{ST} вредности по подгрупама/комплексима биле су у опсегу 0,80197-0,97016. Поређењем парова врста унутар подгрупа/комплекса добијене су статистички значајне вредности F_{ST} за интервал поверења $p \leq 0,05$ које указују на статистички значајну генетичку диференцијацију анализираних врста.

Просечне вредности p дистанци између врста по подгрупама/комплексима кретале су се у опсегу од 0,1% до 9,3%. Међутим, у највећем броју случајева просечне p дистанце између врста истог комплекса биле су унутар опсега од 0,3% до 4,6%. Ова вредност дистанце је израчуната без корекције за модел субституције и могуће је да у одређеној мери одступа од стварних вредности. Некоригована p дистанца се израчунава као удео позиција које се разликују између две секвенце које се пореде. У овом случају могуће вишеструке промене на истој позицији се занемарују, те је ова вредност смислена само онда када је вероватноћа истих мала. Да би дистанца била што прецизније одређена често је потребно извршити корекцију за случај вишеструких промена по позицији и узимајући у обзир однос транзиција и трансверзија. Данас су у употреби различити модели израчунавања еволуционе дистанце који се разликују по сложености. Процена еволуционе дистанце има примену у конструкцији филогенетских стабала, за утврђивање времена дивергенције врста и разумевање механизма еволуције (Nei и Zhang, 2005).

Конструкција филогенетских стабала представља графички приказ еволуционе историје групе организама односно филогеније. У ДНК баркодингу се првобитно



варијабилност секвенци COI гена анализирања NJ методом конструкције стабла дистанци (Hebert и сар., 2003а). Метода је, међутим, критикована као неадекватна с обзиром да се у класичној таксономији користи анализа карактера те је интеграција резултата класичне таксономије и ДНК анализе сувише компликована. Препоручена је примена метода анализе карактера, попут MP и ML (De Salle и сар., 2005). Ове методе су уједно и најзаступљеније у ДНК таксономији сирфида (нпр. Pérez-Bañón и сар., 2003; Mengual и сар., 2006; Ståhls и сар., 2008; 2009; Marcos-García и сар., 2011; Vujić и сар., 2012; 2013; Grković и сар., 2015; Ačanski и сар., 2016; Šašić и сар., 2016; Chroni и сар., 2017; Radenković и сар., 2018). У овом истраживању све три поменуте методе су коришћене за анализу комбинованих секвенци COI гена по комплексима/подгрупама са циљем да се упореде резултујућа филогенетска стабла. Све три методе резултовале су филогенетским стаблима сличне или идентичне топологије, што указује на јасну информацију садржану у анализираним секвенцама. За конструкцију COI и COI+28S филогенетских стабала за целу *Merodon aureus* групу примењена је ML метода, с обзиром да програм RAxML 8.2.8 омогућава брзу анализу великих матрица секвенци (Stamatakis, 2014).

Статистичке вредности подршке клада за филогенетска стабла одређене су *bootstrap* методом. Ова метода, заједно са реципрочном монофилијом, је једна од многих којима се тестира подршка за кладе у процесу раздвајања врста (Collins и Cruickshank, 2012). Примењене методе углавном су биле конзистентне по питању *bootstrap* подршке клада, мада су извесне разлике у вредностима биле присутне. У литератури се вредности *bootstrap* подршке 70-95 сматрају прихватљивом, док се за високо значајну подршку узимају вредности изнад 95. Упркос оваком тренду у тумачењу *bootstrap* подршке нигде се експлицитно не наводи која гранична вредност је адекватна, а ниске вредности не морају обавезно бити показатељ грешака у топологији стабала. На ML стаблу добијеном анализом COI секвенци свих представника *Merodon aureus* групе (Сл. 45) од 28 монофилетских клада које одговарају врстама (или претпостављеним врстама) 15 има *bootstrap* подршку ≥ 95 . Мали број клада са високом *bootstrap* подршком се објашњава тиме што су врсте блиско сродне и вероватно имају кратку независну еволуцију. Наиме, могуће је да у случајевима скорије дивергенције сестринских врста подршка кладама буде ниска, чак и онда када су врсте морфолошки различите и поседују јединствене мутације (Collins и Cruickshank, 2012). Међу наведеним монофилетским кладама има оних које нису задовољиле услов реципрочне



монофилије (нпр. *M. naxius*), што је такође вероватно повезано са кратком независном еволуцијом врста, али може да буде и последица неуједначности броја узорака између врста. Слично је и на комбинованом COI+28S стаблу.

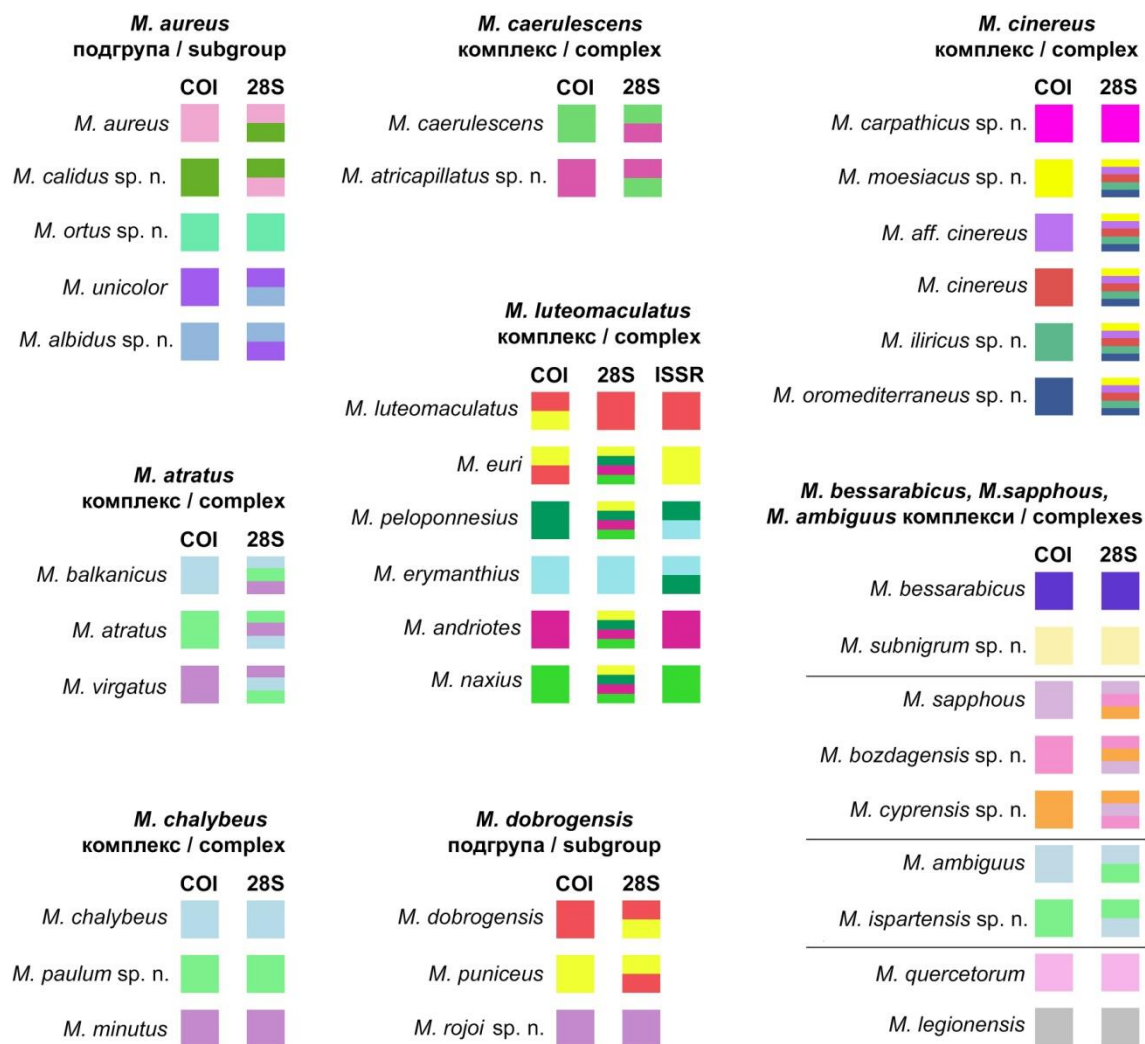
Утврђивање присуства ДНК баркод празнине (енг. *DNA barcoding gap*) вршено је на основу утврђених вредности дистанци између COI секвенци. Анализа је вршена израчунавањем три различита типа дистанци како би се могла уочити зависност резултата од типа примењене дистанце. Одабрана је некоригована р дистанца, с обзиром да представља најпростији начин израчунавања генетичке дистанце између секвенци. Да би се утврдило колики је утицај модела субституције, одређена је и дистанца применом најбољег модела по ВИС критеријуму (видети Материјал и Методе). Додатно, К80 дистанца је изабрана јер је првобитно предложена за примену у ДНК баркодингу (Hebert и сар., 2003а). Број дефинисаних група по комплексу сматран је релевантним уколико се подударало са бројем врста дефинисаних конструкцијом филогенетских стабала. Подударност је утврђена за већину комплекса врста када је коришћена р дистанца, осим у случају *Merodon luteomaculatus* комплекса и *M. chalybeus* комплекса. За дистанце израчунате применом К80 или најбољег модела нуклеотидне супституције број дефинисаних група одступао је у случају *M. aureus* комплекса, *M. bessarabicus* комплекса и *M. chalybeus* комплекса. У случају *M. chalybeus* комплекса резултати АВGD анализе нису подржали поделу врста показану на филогенетским стаблима ни за један тип примењене дистанце. За највећи број комплекса показана је конзистентност у резултатима за сва три типа дистанци у смислу подударности броја група (дефинисаних иницијалним или поновљеним груписањем) са бројем врста одређеним на основу анализе филогенетских стабала (изузетак су *M. aureus* комплекс, *M. luteomaculatus* комплекс и *M. chalybeus* комплекс). Ипак, постојало је одређено варирање у опсегу вредности дистанце на којој је утврђена ДНК баркод празнина. Према истраживњу Collins и сар. (2012) модел субституције не утиче значајно на промену вредности дистанце унутар врста када су те вредности ниске, чиме би могла да се објасни конзистентност резултата код већине анализираних комплекса врста.

Анализа секвенци 28S рРНК гена показала је да је анализирани регион овог гена много мање варијабилан у односу на варијабилност COI гена. Овакав резултат је очекиван с обзиром да се секвенце 28S рРНК гена обично користе у молекуларним анализама виших таксономских категорија (Hwang и Kim, 1999; Patwardhan и сар., 2014). Секвенце су анализирани по подгрупама (*Merodon aureus* подгрупа, *M. cinereus*



подгрупа, *M. bessarabicus* подгрупа, *M. dobrogensis* подгрупа) и за *M. caeruleascens* комплекс и *M. chalybeus* комплекс. Најмањи број генотипова, свега два утврђен је у *M. caeruleascens* комплексу и *M. dobrogensis* подгрупи, а највећи број (11) у *M. bessarabicus* подгрупи. Вредности диверзитета генотипова биле су ниже у односу на COI ген и у опсегу од 0,393 (*M. dobrogensis* подгрупа) до 0,8413 (*M. bessarabicus* подгрупа). Успешност примене секвенци COI гена и 28S рРНК гена у раздвајању врста по комплексима/подгрупама *M. aureus* групе сумирана је на Слици 51. Додатно, конструкција МЈ мреже генотипова 28S рРНК гена за целу *M. aureus* групу показала је одсуство заједничких генотипова за већину комплекса (изузетак су *M. bessarabicus* комплекс, *M. luteomaculatus* комплекс, *M. atratus* комплекс; врсте *M. aerarius* и *M. nisi*).

Уз анализу секвенци COI и 28S рРНК гена, тестирана је и примена ISSR маркера у таксономији *Merodon aureus* групе. ISSR маркери могу бити успешно примењени у циљу раздвајања врста и популација код инсеката (нпр. Abbot, 2001; Luque и сар., 2002; Dušinský и сар., 2006; Kehlmaier и сар., 2010; Ståhls и сар., 2016; Radenković и сар., 2018). Luque и сар. (2002) су показали да ови маркери могу бити успешно примењени у раздвајању морфолошки сличних врста у једној фамилији реда Lepidoptera. У случају блиско сродних врста са кратком независном еволуционом историјом ови маркери могу бити значајни за решавање таксономије истих с обзиром да се ради о брзо еволуирајућим локусима (Kehlmaier и сар., 2010). У овом истраживању ISSR маркери су се показали корисним за раздвајање врста у *M. luteomaculatus* комплексу и омогућили су јасно одвајање 4 врсте. Две врсте, *M. peloponnesius* и *M. andriotes* нису успешно одвојене (Сл. 51). Овакав резултат је врло вероватно последица изабраног опсега дужине бендова у оквиру кога је вршено читавање профила. Додатно, ISSR профили



Слика 51. Успешност анализираних молекуларних маркера у раздвајању врста *Merodon aureus* групе по комплексима и/или подгрупама. / Figure 51. Utility of analysed molecular markers in *Merodon aureus* group species delimitation per complexes and/or subgroups.

добили су применом само једног микросателитског прајмера, (GACA)₄, те је могуће да би избор неког другог резултатовао и нешто другачијим образцем варијабилности услед различите заступљености различитих репетитивних мотива у геному (Abbot, 2001; Luque и сар., 2002; Dušinský и сар., 2006). Успешност анализираних маркера у раздвајању врста *M. luteomaculatus* комплекса сумирана је на Слици 51.

Упркос једноставности процедуре и економске исплативости примене ISSR маркера, постоје одређена ограничења. ISSR маркери су доминантни маркери и као такви омогућавају добијање мање генетичких информација по локусу у односу на кодоминантне молекуларне маркере. Ово ограничење се може превазићи применом већег броја локуса. Због особине доминантности нису најбољи избор за процену генетичког диверзитета, али могу бити успешно примењени за утврђивање

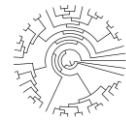


популационе структуре и генетичке диференцијације између популација. Очитавање профила може бити субјективно, а профил може и да варира у зависности од опреме и протокола који се користи. Да би се овај проблем превазишао потребно је очитавати само јасне бендове у оквиру унапред одређеног опсега дужина, а да би резултати могли да се пореде потребно је поштовати идентичан протокол за добијање ISSR профила (Ng и Tan, 2015).

7.2. Детекција *Wolbachia* инфекције и утицај на варијабилност COI гена

Резултати показују да су готово све анализиране врсте *Merodon aureus* групе, са изузетком *M. balkanicus* инфициране *Wolbachia*. Међутим ово није први случај детекције инфекције код сирфида упркос чињеници да до сад није изазвала већу пажњу (Werren и Windsor 2000; Sintupachee и сар., 2006; Evison и сар., 2012).

Wolbachia је унутарћелијска α протео бактерија Arthropoda и Nematoda која може на различите начине да утиче на репродукцију домаћина. *Wolbachia* може узроковати постзиготску репродуктивну инкомпатибилност (цитоплазматска инкомпатибилност) код инсеката, партеногенезу (нпр. код паразитских оса), али и феминизацију генетичких мужјака изопода (Werren и сар., 1995, 1998, 2008). Поред тога *Wolbachia* утиче на митозу у репродуктивном ткиву, може утицати на појаву хромозомских реаранжмана, или утиче на појаву асоцијације са одређеним мтДНК хаплотипом (Werren и сар., 1998). Утичући на појаву бидирекционе цитоплазматске инкомпатибилности може узроковати прекид протока гена између популација исте врсте, али остаје нејасно да ли овај механизам може довести до специјације (Werren и сар., 2008). По правилу бактерија се са инфицираних на неинфициране јединке преноси путем јајне ћелије. Инфицирани мужјаци често имају модификоване сперматозоиде који због тога могу да оплоде само инфициране женке. Наиме да би дошло до развоја зигота потребан је специфичан ”механизам спасавања“ сперматозоида, присутан само у инфицираним јајним ћелијама. Ова појава се назива унидирекциона цитоплазматска инкомпатибилност, док бидирекциона настаје када два различита бактеријска соја инфицирају различите јединке (популације) (за детаље видети Werren и сар., 1998). Утицај *Wolbachia* на мтДНК дивергенцију је веома разноврстан и може узроковати редукцију диверзитета (услед инфекције једним сојем који тежи фиксирању одређеног мтДНК хаплотипа у популацији), повећање диверзитета (услед вишеструких



инфекција), промене у варијабилности у простору (услед инфекције различитих популација различитим бактеријским сојевима), као и парафилију мтДНК (услед хоризонталног трансфера између различитих врста) (Hurst и Jiggins, 2005).

ML анализа секвенци 16S рРНК гена потврдила је да су узорци врста *Merodon aureus* групе инфицирани *Wolbachia* супергрупом А. Успешност детекције *Wolbachia* била је слична ако се пореде резултати PCR амплификације за два примењена молекуларна маркера, 16S рРНК гена и *wsp* ген. У оба случаја за 42 од 45 анализираних узорка добијени су продукти амплификације, за један узорак (*M. balkanicus*) није добијен продукт ни за један од анализираних локуса, док за четири узорка успешно је продукован само један од локуса. У случају умножавања секвенце *wsp* гена детектовани су вишеструки бендови код три узорка указујући на могућу вишеструку инфекцију различитим сојевима бактерије. Ови продукти нису даље анализирани, с обзиром на материјална ограничења истраживања. Када говоримо о квалитету продукованих секвенци, 10% *wsp* секвенци је избачено из даље анализе због лошег квалитета, док су све продуковане 16S секвенце биле задовољавајућег квалитета. Лош квалитет секвенци може бити последица вишеструких инфекција различитим бактеријским сојевима, али може бити и последица контаминације узорка. Добијени резултати указују на високу стопу заступљености *Wolbachia* инфекције од 97,7%. Према процени Јеуракаш и Ноу (2000) стопа инфекције код зглавкара достиже 76%.

Истраживање Bailly-Bechet и сар. (2017) показује да је већина инфицираних врста зглавкара заражена *Wolbachia* тек скорије и да се већина догађаја заражавања и губитка инфекције десила у последњих милион година, премда неки случајеви указују на могућност дугорочне *Wolbachia* инфекције. Губитак инфекције је вероватно последица несавршености матерналног преношења, али у одређеној мери може бити последица ишчезавања *Wolbachia* из популација. Узимајући у обзир догађаје на нивоу популација Bailly-Bechet и сар. (2017) су проценили да неинфициране линије бивају заражане на приближно сваких 9,3 милиона година, док инфициране губе инфекцију сваких 7 милиона година. Узимајући у обзир овакав сценарио могуће је да је динамика стицања и губитка *Wolbachia* инфекције обликовала мтДНК генеалогичку врсту. У случају *Merodon aureus* групе могуће објашњење за раздвајање врста у две главне класе на COI стаблу (Сл. 50) може бити последица утицаја *Wolbachia* на рану еволуцију различитих мтДНК линија. То би значило да је древна *Wolbachia* инфекција обликовала генеалогичку COI гена *M. aureus* групе. У неколико студија показано је да *Wolbachia*



може утицати на специјацију узрокујући репродуктивну изолацију кроз развој постзиготских или презиготских механизма (Bordenstein и сар., 2001; Jaenike и сар., 2006; Koukou и сар., 2006; Telschow и сар., 2007; Miller и сар., 2010). Тренутна дистрибуција wsp хаплотипова међу врстама *M. aureus* групе указује на инфекцију различитим *Wolbachia* сојевима, који су вероватно последица скоријих догађаја инфекције. Ипак, тренутно није могуће уочити јасан образац повезаности између инфекције одређеним сојем и генеалогиче COI гена. Према томе, већи број узорак по врсти треба да буде тестиран на инфекцију пре него што се донесе коначан закључак о утицају *Wolbachia* на специјацију у *M. aureus* групи.

7.3. Молекуларни диверзитет у служби таксономије

Таксономија *Merodon aureus* групе се дуго сматрала великим изазовом за таксономе узимајући у обзир одсуство конзистентних морфолошких разлика између таксона. Структура гениталија мужјака је веома једноставна и слична код свих представника групе (Radenković и сар., 2011, 2018; Šašić и сар., 2016; Veselić и сар., 2017), те није могуће са сигурношћу детерминисати врсте. Скорија истраживања указују на висок диверзитет врста *M. aureus* групе услед присуства криптичних врста и/или комплекса врста (Šašić и сар., 2016; Veselić и сар., 2017; Radenković и сар., 2018). Значајан напредак на пољу описа нових врста, а посебно криптичних омогућила је примена молекуларних метода у таксономији (Bickford и сар., 2007). У радовима Šašić и сар. (2016) и Radenković и сар. (2018) примена молекуларних метода допринела је опису 2 нове врсте *M. atratus* комплекса (*M. cinereus* подгрупа) и 6 нових врста *M. luteomaculatus* комплекса (*M. bessarabicus* подгрупа). Додатно, током последњих неколико година примена геометријске морфометрије у анализи морфолошких структура се показала као значајна на пољу открића нових врста (Аџански и сар., 2016; Šašić и сар., 2016; Radenković и сар., 2018).

На основу поделе коју су дали Šašić и сар. (2016) унутар *Merodon aureus* групе разликујемо 5 подгрупа: *M. aureus* подгрупу, *M. bessarabicus* подгрупу, *M. chalybeus* подгрупу, *M. cinereus* подгрупу и *M. dobrogensis* подгрупу. У овом истраживању свака од поменутих подгрупа анализирана је применом секвенци COI и 28S рРНК гена. Унутар подгрупа морфолошки су дефинисани комплекси врста (на основу детерминације проф. др. Анте Вујић и публикација Šašić и сар. (2016), Veselić и сар.



(2017) и Radenković и сар. (2018)) у оквиру којих је молекуларним методама утврђено постојање 2-6 криптичних и блиско сродних врста. Анализама је обухваћена 42 претходно описана и/или нова врста.

***Merodon aureus* подгрупа** обухвата *M. aureus* комплекс и *M. unicolor* комплекс у оквиру којих анализа секвенци COI гена указује на постојање 3 (*M. aureus*, *M. calidus* sp. n. и *M. ortus* sp. n.) и 2 (*M. unicolor* и *M. albidus* sp. n.) криптичне врсте. Показано је да врсте формирају монофилетске кладе на филогенетским стаблима. Утврђено је да нема заједничких хаплотипова за различите врсте. Потврђена је висока варијабилност између врста применом AMOVA анализе. Подела на врсте у *M. aureus* комплексу потврђена је ABGD анализом некоригованих p дистанци, а у *M. unicolor* комплексу анализом сва три типа примењених дистанци (p дистанци, T92, K80).

COI секвенца узорка AU713 која је детерминисана као део *Merodon aureus* комплекса (*M. calidus* sp. n.), на филогенетским стаблима је придружена *M. albidus* sp. n. клади. Када се изузме могућа контаминација (ДНК је два пута изолована и тестирана) ово може бити објашњено као последица интрогресије митохондријалне ДНК, али и као последица генетичких ефеката инфекције јединки ендосимбионтским бактеријама (видети део везан за тестирање на *Wolbachia* инфекцију). Интрогресија подразумева инкорпорацију гена једне врсте у геном друге врсте, и најчешће је последица хибридизације између две врсте праћене повратним укрштањем (Anderson и Hubricht, 1938; Anderson, 1949). Генерално је прихваћено да је интрогресија митохондријалних ДНК маркера чешћа у односу на нуклеарне узимајући у обзир да је митохондријални геном независан од нуклеарног, па према томе и од гена који доприносе репродуктивној изолацији, а који по правилу не подлежу интрогресији (Barton и Jones 1983; Harrison 1989; Harrison и Larson, 2014).

Анализа 28S секвенци *Merodon aureus* подгрупе указала је на нижи степен дивергенције у поређењу са COI секвенцама. На основу анализе 28S секвенци није могуће одвојити врсте *M. unicolor* комплекса. У *M. aureus* комплексу *M. aureus* и *M. calidus* sp. n. имају један заједнички генотип, док преостали генотипови (са изузетком генотипа V) ових врста чине јасно одвојене групе. Секвенце *M. aureus* које деле исти 28S генотип са *M. calidus* sp. n. секвенцама одговарају неким од узорака сакупљеним на Старој Планини (AU695 - AU697, AU699), а заједно са њима је и генотип V врсте *M. aureus* који такође припада узорку са Старе Планине (AU169). Ови генотипови су на MJ



мрежи груписани са преосталим генотиповима врсте *M. calidus* sp. n. Узимајући у обзир да се Стара планина налази у региону преклапања ареала врста, могуће је да су поменуте јединке (AU695 - AU697, AU699, AU169) услед велике морфолошке сличности погрешно детерминисане као *M. aureus*, а заправо припадају *M. calidus* sp. n., у том случају би се њихово груписање са *M. aureus* на основу COI секвенци могло објаснити као последица интрогресије митохондријалне ДНК између врста.

Дистрибуција врста *Merodon aureus* и *M. calidus* sp. n. указује на могућност да су ове врсте настале услед раздвајања некад шире распрострањене врсте у рефугијуме Апенинског и Балканског полуострва током периода глацијација у Плеистоцену. Ова полуострва заједно са Иберијским чине три главна рефугијална центра Медитеранских врста (Schmitt, 2007). Са наступањем климатски повољног периода дошло је до експанзије врста, *M. aureus* ка Алпима на северу и Балканском полуострву на западу (док су на истоку Алпи ипак представљали непремостиву препреку за даље ширење) и *M. calidus* sp. n. са југа ка северу Балканског полуострва. Према овом схватању Стара планина се налази у зони секундарног контакта врста *M. aureus* и *M. calidus* sp. n. Оваква шема постгласијалне експанзије одговара „скакавац” типу (Hewitt, 1999; Schmitt, 2007).

***Merodon caerulescens* комплекс** на основу анализе COI секвенци чини комплекс две криптичне врсте: *M. caerulescens* (са острва Родос) и *M. atricapillatus* sp. n. (са острва Крит). На MP и ML стабалима су ове врсте дефинисане као монофилетске класе са значајном *bootstrap* подршком (MP: 79 и 93, и ML: 81 и 97). Насупрот томе, одступање топологије NJ стабла (Сл. П2 у Прилогу 2) од MP и ML стабала је вероватно последица одступања примењеног TN93 модела еволуције од модела који је потврђен као најбољи еволуциони модел, *General Time Reversible* (GTR) модел. Наиме, програм MEGA који је коришћен за конструкцију NJ стабла нема опцију за примену GTR модела те је примењен први наредни модел одабран у листи најбољих, а за који програм даје опцију за примену. Дивергенција *M. caerulescens* и *M. atricapillatus* sp. n. су додатно потврђене ABGD и AMOVA анализама, као и конструкцијом MJ мреже хаплотипова. Настала генетичка дивергенција се може објаснити прекидом протока гена услед изолованости острвских популација.

За разлику од COI секвенци, 28S секвенце нису показале довољну варијабилност за раздвајање врста у *M. caerulescens* комплексу.



Унутар *Merodon cinereus* подгрупе анализирана су два комплекса криптичних врста *M. cinereus* комплекс и *M. atratus* комплекс, оба присутна на Балканском полуострву и у Централној Европи на Алпима. Поред тога у анализу је укључена и врста *M. aerarius* распрострањена на северу Балкана, Апенинском полуострву, укључујући острва Сардинија и Корзика (Сл. П2 у Прилогу 3).

На основу анализе 28S секвенци могуће је разликовати *Merodon cinereus* комплекс од *M. atratus* комплекса и врсте *M. aerarius*, међутим није могуће одвојити *M. aerarius* од *M. atratus* комплекса (Сл. 22). *M. aerarius* међутим је морфолошки различита од врста *M. cinereus* комплекс и *M. atratus* комплекса

Генетичка анализа *Merodon cinereus* комплекса базирана на дивергенцији COI секвенци указала је на комплекс 6 криптичних врста: *M. moesiacus* sp. n. (*M. cinereus* C према Milankov и сар., 2008), *M. carpathicus* sp. n., *M. cinereus*, *M. aff. cinereus*, *M. oromediterraneus* sp. n. (*M. cinereus* A према Milankov и сар., 2008) и *M. iliricus* sp. n. Подела на 6 врста показана је на основу анализе филогенетских стабала, а врсте су потврђене и у ABGD анализи за три типа дистанци (некоригована p дистанца, T92 и K80), чак и упркос чињеници да је просечна p дистанца између *M. cinereus* и *M. aff. cinereus* свега 0,5%. AMOVA анализа потврдила је високу варијабилност између врста што уз одсуство дељених хаплотипова и начин груписања на MJ мрежи додатно потврђује дивергенцију између врста.

Merodon cinereus комплекс чине врсте прилагођене ширем опсегу надморских висина, од 0 до 3000 метара са дистрибуцијом у Алпима и планинским областима Балканског полуострва (Аџански, 2016). Додатно врста *M. carpathicus* sp. n. пронађена је на Карпатима (Сл. П2 у Прилогу 3). Вредности p дистанце су у складу са подацима за *M. avidus* комплекс, *M. atratus* комплекс и *M. luteomaculatus* комплекс за које је показано да се специјација појединих таксона одвијала током Плеистоцена (Аџански и сар., 2016; Šašić и сар., 2016; Radenković и сар., 2018). На основу географске дистрибуције врста и опсега просечне вредности p дистанце између врста долази се до закључка да се специјација *M. cinereus* комплекса врста такође дешавала током смене периода глацијација/интерглацијација у Плеистоцену. Претпоставка је да су популације предачке врсте током ледених доба биле распоређене у рефугијалним центрима на Апенинском и Балканском полуострву док су се са наступањем климатски повољног периода повлачиле ка планинама што би условило смањење протока гена. Међутим, узимајући у обзир опсег надморских висина на којима се јављају и одсуство



географских баријера јасно је да је специјација морала бити узрокована неким додатним фактором који би убрзао диверзификацију (видети Knowles, 2000). Аџански (2016) и Миличић и сар. (у припреми) су указали на значајне разлике у еколошким захтевима између *M. cinereus*, *M. oromediterraneus* sp. n. и *M. moesiacus* sp. n. истичући деловање природне селекције као покретачке силе у процесу специјације. Међутим, генетичке врсте *M. iliricus* sp. n. и *M. aff. cinereus* нису препознате као независни ентитети применом геометријске морфометрије крила и стила (део гениталног апарата мужјака), већ као део *M. moesiacus* sp. n. и *M. cinereus* (Аџански, 2016). Према томе да би ове врсте биле подржане као валидне неопходне су анализе додатних молекуларних маркера (ако је могуће нуклеарних).

***Merodon atratus* комплекс** је комплекс који чине три врсте *M. atratus*, *M. virgatus* (*M. cinereus* В према Milankov и сар., 2008) и *M. balkanicus* (Šašić и сар., 2016). Молекуларна анализа COI секвенци врста *M. atratus* комплекса потврдила је њихово монофилетско порекло конструкцијом MP и ML стабала. У овим анализама *M. balkanicus* је потврђена као сестринска врста за кластер (*M. atratus*)+(*M. virgatus*). На NJ стаблу топологија је нешто другачија, односно кластер (*M. atratus*)+(*M. virgatus*) је уметнут унутар *M. balkanicus* кладе. Разлика у топологији може бити последица избора модела еволуције за конструкцију NJ стабла. Дакле, MP и ML анализама постигнута је јаснија резолуција чак и ако поредимо добијене резултате са резултатима приказаним у раду Šašić и сар. (2016) где топологија стабала (MP и ML) показује *M. virgatus* као уметнуту кладу унутар *M. atratus* кладе, док је њима сестринска клада *M. balkanicus*. У овом случају разлика је вероватно настала услед примене секвенци различитих врста за аутгрупе. Без обзира на претходно описане разлике у топологији стабла концепт три криптичне врсте је подржан тестирањем присуства баркод празнине (енг. *barcode gap*) и AMOVA анализом. Додатно, утврђено је одсуство заједничких хаплотипова, а на MJ мрежи је уочљиво груписање хаплотипова у три групе на основу припадности врсти.

Šašić и сар. (2016) су на основу процене времена дивергенције између врста *Merodon atratus* комплекса потврдили да је до специјације дошло током смене ледених доба у Плеистоцену. Специјација се догодила два пута у периодима Гинц-Миндел и Рис-Миндел интергласијација услед фрагментације хабитата повлачењем на више надморске висине. Врсте овог комплекса су прилагођене на хладнију климу чиме се објашњава повлачење ка вишим надморским висинама у периоду интергласијација (Hewitt, 1996; Knowles, 2000; Stewart и сар., 2010). Додатно, Šašić и сар. (2016) су



указали на еколошку дивергенцију између врста комплекса, а што је у складу са Knowles (2000) и његовим објашњењем да кратак временски период смене глацијација/интерглацијација не инхибира специјацију ако је она потпомогнута сексуалном селекцијом и/или природном селекцијом еколошки диференцираних таксона. Врсте *M. atratus* комплекса присутне су на надморским висинама 1000 - 3000 метара у планинским регионима Балкана и на Алпима (Сл. П2 у Прилогу 3, Šašić и сар., 2016).

Merodon aerarius је врста распрострањена на Балканском и Апенинском полуострву, као и на острвима Сардинија и Корзика. Таксономски статус ове врсте још увек није потврђен. Упркос сличности географске дистрибуције са врстама *M. cinereus* комплекса и *M. atratus* комплекса анализа COI секвенци ове врсте указује на одсуство специјације. Популације континенталног дела Италије, Стара планина и Голија поседују јединствене COI хаплотипове, док Сардинија и Корзика деле Нар21, а Орјен, Морињ и Велебит деле Нар9 (Сл. 21). На основу покушаја груписања хаплотипова на МЈ мрежи могуће је уочити одсуство мешања групе хаплотипова континенталног дела Италије, Сардиније и Корзике са хаплотиповима популација са Балкана. Ово указује на смањење или одсуство протока гена са Балканским популацијама. Могуће је спекулисати да је одсуство специјације последица одржавања сличних и/или истих еколошких захтева врсте током времена, међутим да би се донели веродостојни закључци потребни су додатни докази.

Merodon bessarabicus подгрупа обухвата 4 комплекса криптичних врста (*M. luteomaculatus* комплекс, *M. bessarabicus* комплекс, *M. ambiguus* комплекс, *M. sapphous* комплекс) и 5 додатних врста изван поменутих комплекса (*M. adriaticus*, *M. flavicornis*, *M. quercetorum*, *M. legionensis*, *M. rufipes*) (за морфолошки опис врста видети Veselić и сар., 2017).

Генетичка анализа *Merodon luteomaculatus* комплекса указала је на шест криптичних врста: *M. luteomaculatus*, *M. euri*, *M. peloponnesius*, *M. erymanthius*, *M. andriotes* и *M. naxius*. На МР и ML стабалима COI гена дефинисано је 5 монофилетских клада које одговарају врстама *M. peloponnesius*, *M. erymanthius*, *M. andriotes*, *M. naxius* и кластеру *M. luteomaculatus*+*M. euri*. Сличан резултат добијен је конструкцијом NJ стабла, али је овде *M. erymanthius* исходиште за кластер у оквиру кога се издвајају *M. peloponnesius*, *M. andriotes* и *M. luteomaculatus*+*M. euri*. *M. naxius* клада је разрешена као сестринска клада за кластер који чине преосталих 5 врста комплекса. ABGD анализама

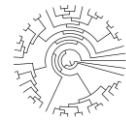


T92 и K80 дистанци за COI дефинисано је 5 „хипотетичких врста” које одговарају *M. luteomaculatus*+*M. euri*, *M. peloponnesius*, *M. erymanthius*, *M. andriotes* и *M. naxius*. Слично томе дефинисано је и пет хаплотипских група на MJ мрежи, при чему *M. luteomaculatus* и *M. euri* чине једну хаплотипску групу, а преостале одговарају преосталим врстама из комплекса. Нису забележени заједнички, дељени хаплотипови између врста у комплексу, што је вероватно узроковано одсуством протока гена који је условио формирање независних генофондова врста.

Као и у претходно описаним комплексима и подгрупама 28S секвенце су биле много мање варијабилне од COI секвенци. Упркос томе на MJ мрежи 28S генотипова *Merodon bessarabicus* подгрупе *M. luteomaculatus* комплекс има 3 за комплекс јединствена генотипа (Сл. 34). Врсте *M. euri*, *M. peloponnesius*, *M. andriotes* и *M. naxius* деле један генотип, док *M. luteomaculatus* и *M. erymanthius* поседују јединствене генотипове што указује на њихову генетичку диференцијацију у односу на остале врсте комплекса. Додатно, анализом ISSR профила *M. luteomaculatus* комплекса успешно су раздвојене врсте *M. luteomaculatus*, *M. euri*, *M. erymanthius* и *M. naxius*, док *M. peloponnesius* и *M. andriotes* нису раздвојене (Сл. 51).

Merodon luteomaculatus, *M. euri*, *M. peloponnesius*, *M. erymanthius*, *M. andriotes* и *M. naxius* су применом интегративне таксономије потврђене и описане као валидне врсте од стране Radenković и сар. (2018). Аутори су интегрисали молекуларне податаке, податаке геометријске морфометрије крила и стила, и податаке о дистрибуцији врста како би постигли одговарајућу резолуцију у дефинисању граница врста. Додатно, указали су на потенцијал ISSR анализе у молекуларној таксономији сирфида. На основу тренутне дистрибуције врста на Балканском полуострву и Егејским острвима (Сл. ПЗ у Прилогу 3) предложили су хипотетички биогеографски сценарио комплекса указујући на утицај палеогеографске историје источног Медитерана на процес специјације у *M. luteomaculatus* комплексу. Дефинисана су два главна фактора у процесу специјације: 1) фрагментација ареала узрокована променама у нивоу мора током Плиоцена и Плеистоцена, и повлачењем у одвојене рефугијуме током Плеистоцена; 2) формирање независних генских фондова врста услед генетичког дрифта и смањења или одсуства протока гена.

На основу примењене генетичке анализе можемо изнети хипотезу о могућем постајању 2 криптичне врсте *Merodon bessarabicus* комплекса (*M. bessarabicus* и *M. subnigrum* sp. n.), 3 криптичне врсте *M. sapphous* комплекса (*M. sapphous*, *M.*



bozdagensis sp. n. и *M. cyprensis* sp. n.) и 2 криптичне врсте ***M. ambiguus* комплекса** (*M. ambiguus* и *M. ispartensis* sp. n.). Конструкцијом COI филогенетских стабала показано је да комплекси немају монофилетско порекло и да су често врсте различитих комплекса међусобно генетички ближе него врсте унутар једног комплекса. Слично је потврђено и на основу вредности просечне некориговане р дистанце између анализираних врста, као и конструкцијом мреже хаплотипова (Сл. 33). На стаблима су уочљиве две главне кладе. Прву (*M. subnigrum* sp. n.)+(*M. ambiguus*+*M. bozdagensis* sp. n.) чини кластер који обухвата две врсте са Балканског полуострва (*M. subnigrum* sp. n., *M. ambiguus*) и једну са Анатолијског полуострва (*M. bozdagensis* sp. n.). Друга главна клада (*M. bessarabicus*)+(*M. quercetorum*+*M. legionensis*)+(*M. sapphous*)+(*M. cyprensis* sp. n.)+(*M. ispartensis* sp. n.)) обухвата врсте са Анатолијског полуострва и острва Кипар (*M. cyprensis* sp. n.), а њима су придружене и две врсте са Иберијског полуострва (*M. legionensis* и *M. quercetorum*). Према томе врсте сва три комплекса раздвојене су у две поменуте главне кладе. Овакав образац указује на одређену географску структурираност дистрибуције мтДНК. Међутим врста *M. bozdagensis* sp. n. иако пореклом са Анатолијског полуострва и морфолошки различита чини једну кладу са *M. ambiguus* са Балканског полуострва. Ове две врсте поседују и заједничке COI хаплотипове. Додатно, унутар *M. sapphous* кладе смештене су и две *M. ispartensis* sp. n. јединке (AU472 и AU477), што може бити последица интрогресије митохондријалне ДНК врсте *M. sapphous* у генетичко окружење *M. ispartensis* sp. n. Врсте са Иберијског полуострва *M. legionensis* и *M. quercetorum* формирају једну монофилетску кладу што је било очекивано с обзиром да је одсуство дивергенције у COI секвенцама претходно документовано (Mengual и сар., 2006)

За разлику од анализе COI секвенци, анализа 28S секвенци указује на знатно једноставнији образац генетичке диференцијације и омогућава разликовање комплекса, а у неким случајевима и врста. Наиме, на МЈ мрежи 28S генотипова *Merodon sapphous* комплекс обухвата два јединствена генотипа, врсте *M. ambiguus* комплекса деле један генотип, док врсте *M. bessarabicus* комплекса (*M. bessarabicus* и *M. subnigrum* sp. n.) имају свака по један јединствен генотип. Додатно врсте *M. quercetorum* и *M. legionensis* такође имају јединствене генотипове. Како су 28S секвенце конзервативније у односу на COI секвенце, дефинисани генотипови се разликују у свега неколико мутационих корака (1-4), те остаје питање адекватности њихове примене на нижим таксономским нивоима.



Образац дистрибуције генетичког диверзитета присутан у *Merodon bessarabicus* подгрупи вероватно није последица једног појединачног фактора. Комплексна геолошка историја Медитеранске регије, драстичне промене климе током Плеистоцена, али и генетичке последице инфекције врста ендосимбионтском бактеријом (*Wolbachia*) су фактори који су могли имати утицај.

***Merodon chalybeus* комплекс** чине врсте *M. chalybeus*, *M. minutus* и *M. paulum* sp. n. На филогенетским стаблима добијеним анализом COI секвенци *M. chalybeus* је одвојена као монофилетска клада док *M. minutus* и *M. paulum* sp. n. чине један кластер унутар кога се издваја *M. minutus* у посебну монофилетску кладу са високом *bootstrap* подршком. Врсте из комплекса немају заједничке COI хаплотипове и на МЈ мрежи чине три јасно одвојене хаплотипске групе. Врста *M. chalybeus* показује високу варијабилност COI секвенци, што се може сагледати на основу топологије стабала, као и из односа броја хаплотипова према броју секвенци. Висок степен варијабилности може објаснити и неслагање броја група („хипотетичких врста“) добијених ABGD анализом са бројем врста дефинисаних на основу резултата филогенетске анализе. Наиме, у овој анализи је могуће дефинисати четири групе од којих две одговарају *M. minutus* и *M. paulum* sp. n., и две које одговарају *M. chalybeus*. Груписање *M. chalybeus* секвенци на две групе не показује никакву правилност узимајући у обзир да се у обе групе налазе секвенце узорака из Шпаније и Марока. Ове две групе видљиве су и на филогенетским стаблима као две кладе унутар кладе *M. chalybeus*. Како би се добила јаснија слика генетичке варијабилности врсте *M. chalybeus* потребно је анализирати већи број узорака и покрити већи број локалитета унутар ареала врсте. Анализом 28S секвенци показано је да свака врста поседује само јединствене генотипове што иде у прилог њиховој генетичкој диференцираности, али су разлике између секвенци генотипова веома мале (1-6 мутационих корака).

Дистрибуције врста *Merodon chalybeus* комплекса указује на алопатричку специјацију. Врста *M. chalybeus* присутна је на Иберијском полуострву и Магребу, али је нема источно од Пиринеја који су вероватно представљали природну препреку ширењу врсте ка централној и источној Европи. Врста *M. minutus* је присутна у приморским областима Балканског полуострва, Грчким острвима и на Криту, а *M. paulum* sp. n. на Сицилији (Сл. 5 у Прилогу 3; видети Аџански, 2016).

***Merodon dobrogensis* подгрупа** обухвата врсте *M. rojoi* sp. n., *M. puniceus* и *M. dobrogensis*, при чему последње две чине *M. dobrogensis* комплекс. *M. rojoi* sp. n. се на



COI стаблима одваја као сестринска клада за кластер (*M. puniceus*)+(*M. dobrogensis*). На основу вредности p дистанце (0,8%) може се закључити да су *M. puniceus* и *M. dobrogensis* блиско сродне врсте са кратком независном еволуцијом, док је *M. rojoi* sp. n. много дивергентнија (p дистанце: 8,7% и 8,8%). На MP и NJ стаблима ове две врсте су (иако са најчешће ниском *bootstrap* подршком) дефинисане као реципрочно монофилетске кладе, док се на ML стаблу *M. dobrogensis* одваја од *M. puniceus* као монофилетска клада са високом вредношћу *bootstrap* подршке. Врсте не деле заједничке хаплотипове. Додатно, ABGD анализа је подржала концепт три врсте унутар подгрупе. 28S секвенце се нису показале довољно варијабилне за одвајање *M. puniceus* и *M. dobrogensis*.

Врста *Merodon dobrogensis* регистрована је у Румунији и североистоку Грчке, *M. puniceus* на острву Лезбос и на Анатолијском полуострву, док је *M. rojoi* sp. n. присутна у централној Грчкој и на Пелопонезу (Сл. П6 у Прилогу 3, Аџански и сар., 2016).

На Балканском полуострву забележено је 17 врста из свих пет подгрупа *M. aureus* групе (Сл. 48). Овај резултат је у складу са забележеном високом варијабилношћу врста осолених мува и генерално животињских врста присутном на Балканском полуострву (сумирано у Savić, 2008).

Како је речено, у свим анализираним комплексима резултати показују дивергенцију COI секвенци између врста која је најчешће у опсегу од 0,3-4,6%. Ове вредности су у опсегу вредности забележених за криптичне, блиско сродне врсте сирфида. Код *Merodon equestris* групе (Marcos-García и сар., 2011), *M. avidus* комплекса из *M. nigritarsis* групе (Popović и сар., 2015), као и код других родова сирфида попут *Pipiza Fallén*, 1810 и *Chrysotoxum Meigen*, 1803 (Syrphidae: Syrphinae) (Vujić и сар., 2013; Nedeljković и сар., 2015) дивергенција COI секвенци између криптичних врста је била у опсегу 0,3-2,5%. Веома често дивергенција код криптичних, блиско сродних врста не достиже вредност од 2% колика је предложена гранична вредност дивергенције за дефинисање граница врста (Hebert и сар., 2003). Уколико би се водили овом граничном вредношћу многе криптичне врсте не би биле препознате као независни ентитети. Додатно, проблем представљају и случајеви где две морфолошки потпуно различите врсте имају идентичан COI (нпр. Mengual и сар., 2006; Sheffield и сар., 2009; Stahls и сар., 2009) или врсте које показују ниво дивергенције који превазилази карактеристичне



вредности дивергенције између врста у одређеној групи (Cognato, 2006). Према томе, свака група врста треба да се посматра одвојено и у вези са другим релевантним информацијама важним за таксономију. Да би се врсте раздвојиле на основу нивоа генетичке дивергенције потребно је да постоји опсег дивергенције у оквиру кога се дивергенција унутар и између врста не поклапају. Постојање овог опсега је могуће проверити нпр. ABGD анализом, али добијени резултат увек треба посматрати као хипотезу о раздвајању врста која мора бити поткрепљена додатним доказима (Puillandre и сар., 2012).

ML анализом свих секвенци COI гена, за целу *Merodon aureus* групу, потврђена је монофилија за укупно 27 таксона. Уколико посматрамо комплексе, COI ген се показао неадекватним у утврђивању монофилетског порекла комплекса с обзиром да само два (*M. caeruleus* комплекс и *M. chalybeus* комплекс) формирају монофилетске кладе на ML стаблу (Сл. 45). Нешто боља резолуција добија се када се у анализу укључе 28S секвенце и комбинују са COI секвенцама. На овај начин 32 врсте су потврђене као монофилетске, али на нивоу комплекса нема промена (Сл. 46). Независна анализа MJ мреже 28S генотипова указује на одређени потенцијал у раздвајању комплекса, с обзиром на одсуство заједничких генотипова за већину комплекса (7 од 11).

Анализа свих добијених COI секвенци и комбинованих COI+28S секвенци није дала јасну слику филогеније *Merodon aureus* групе. Добијена филогенетска стабла указују на учесталост парафилије и полифилије врста. Парафилија се односи на случај када су све секвенце једне или више врста филогенетски „уметнуте“ међу секвенце друге парафилетске врсте, док се полифилија односи на случај када су различите секвенце полифилетске врсте филогенетски распоређене са секвенцама друге врсте тако да не образују директне филогенетске везе једна са другом (Funk и Omland, 2003). Како је претходно речено интрогресија и некомплетно раздвајање генских линија (енг. *incomplete lineage sorting*) које прате скорију специјацију су најчешће главни узроци полифилије врста (Funk и Omland, 2003; Harrison и Larson, 2014). Међутим, када говоримо о *M. aureus* групи постоји могућност додатног генетичког ефекта *Wolbachia* инфекције на мтДНК.

Треба истаћи да у овом истраживању примарни циљ у конструкцији филогенетских стабала није била потврда филогенетских односа већ раздвајање врста. Наиме, информације о пореклу врста важне су у разумевању диверзитета врста, али



нису неопходне за раздвајање врста и њихов опис. Додатно у филогенетским студијама је потребно користити више маркера како би се поуздано приказали еволутивни односи између врста. У идеалном случају мултилокусни подаци би дали значајан допринос и у раздвајању врста, али је често потребно продуковати секвенце за велики број узорака што захтева додатно време и економска улагања (Goulding и Dayrat, 2016).

Упркос значајном напретку на пољу таксономије криптичних врста применом техника ДНК секвенционирања у употреби је ограничен сет генетичких маркера који су корисни у интегративној таксономији блиско сродних врста сирфида. Најчешће су у употреби секвенце COI гена (нпр. Pérez-Banon и сар., 2003; Radenković и сар., 2011, 2017; Vujić и сар., 2013; Аčanski и сар., 2016; Šašić и сар., 2016; Chroni и сар., 2017; Grković и сар., 2017), али у неким случајевима и ITS2 секвенце (Masetti и сар., 2006; Nedeljković и сар., 2013; Haarto и Ståhls, 2014). 28S секвенце се ретко користе у таксономији на нивоу блиско сродних врста због ниске варијабилности, али се у неким случајевима могу показати као корисне уз анализу секвенци COI гена (Radenković и сар., 2018; Kočiš Tubić и сар., у припреми). Додатно, ISSR маркери су се показали корисним на нивоу популација и блиско сродних врста у роду *Merodon* (Ståhls и сар., 2016; Radenković и сар., 2017) што је потврђено и овим истраживањем. У *M. aureus* групи како се показало COI ген је најинформативнији, 28S рРНК ген даје одређену информацију корисну у молекуларној таксономији, али је и упркос томе врло конзервативан за ниво блискосродних врста. COI ген, међутим није у потпуности поуздан маркер, ако узмемо у обзир ограничења митохондријалних маркера (описано у Прегледу литературе), те постоји потреба за употребом додатних нуклеарних маркера. Као кандидат маркер намеће се ITS2, али се у пракси показало да га је веома тешко амплификовати за врсте ове групе (лично искуство). Другу опцију представља карбамоилфосфатсинтаза-аспартат (CPS) регион транскарбамоилаза-дихидротатаза (CAD) гена. За разлику од ITS2 који је у геному присутан у већем броју копија CAD је код Diptera присутан у једној генској копији (Moulton и Wigemann, 2004). Међутим, за анализу овог гена потребна је ДНК екстрахована из свежег материјала (Ståhls, лично искуство). Додатно, у будућности се предвиђа примена техника секвенционирања нове генерације (енг. *next generation sequencing*) и примена приступа геномике у решавању таксономије врста (Goulding и Dayrat, 2016). За сада су геномски приступи сувише финансијски захтевни за примену у таксономији.



8. Закључак

Молекуларни диверзитет *Merodon aureus* групе проучаван је анализом варијабилности секвенци митохондријалног COI гена и нуклеарног 28S рРНК гена. Примењене методе анализе секвенци показале су конзистентност добијених резултата. У свим анализираним комплексима врста показана је већа варијабилност секвенци COI гена у односу на секвенце 28S рРНК гена.

Диверзитет секвенци COI гена указао је на присуство већег броја криптичних врста у оквиру *Merodon aureus* групе, а на основу чега су дефинисани следећи комплекси криптичних врста: *M. aureus* комплекс, *M. unicolor* комплекс, *M. caerulescens* комплекс, *M. atratus* комплекс, *M. cinereus* комплекс, *M. luteomaculatus* комплекс, *M. bessarabicus* комплекс, *M. sapphous* комплекс, *M. ambiguus* комплекс, *M. chalybeus* комплекс, *M. dobrogensis* комплекс.

Анализа секвенци COI гена по комплексима је указала на одсуство заједничких хаплотипова за врсте унутар истог комплекса, али је могуће да врсте различитих комплекса исте подгрупе деле исти хаплотип (нпр. *Merodon ambiguus* и *M. bozdagensis* sp. n.).

Секвенце 28S рРНК гена су се у већини случајева показале као конзервативне за утврђивање дивергенције између врста, али у комбинацији са COI геном могу бити значајне у дефинисању комплекса или подгрупа врста *Merodon aureus* групе.

Овим истраживањем је показано да ISSR маркери имају потенцијал у утврђивању присуства криптичних врста *Merodon luteomaculatus* комплекса, те се препоручује тестирање истих и на другим комплексима криптичних врста *M. aureus* групе.

Специјација унутар комплекса врста *Merodon aureus* групе може се објаснити у светлу рељефних одлика и геолошке историје анализираног региона, драстичних климатских промена током Плеистоцена и фрагментацијом хабитата по острвском типу.

Додатно, показано је присуство ендосимбионтске бактерија из рода *Wolbachia* код свих анализираних врста *Merodon aureus* групе изузев *M. balkanicus*. Анализа бактеријских секвенци 16S рРНК гена указује на присуство *Wolbachia* супергрупе А



код свих инфицираних представника групе, док анализа секвенци *wsp* гена указује на присуство различитих бактеријских сојева.

Филогенетски односи између врста *Merodon aureus* групе нису јасно разрешени на основу анализе секвенци *COI* гена, нити у комбинованој анализи са секвенцама *28S rРНК* гена. Могуће је да је *Wolbachia* инфекција имала утицај на еволуцију мтДНК и тиме допринела нелогичностима у топологији филогенетских стабала. Упркос томе резултати овог истраживања нису довољни за коначне закључке о утицају *Wolbachia*. Додатно, с обзиром да већина комплекса обухвата блиско сродне врсте са кратком независном еволуцијом, процеси попут интрогресије и непотпуног раздвајања генских линија су додатно могли да маскирају стварну слику еволутивних односа између врста.

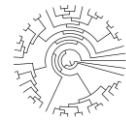
У циљу потврде статуса новопронађених врста препоручује се комбиновање ових резултата са анализом додатних молекуларних маркера, морфолошким подацима, морфометријом, еколошким подацима и свим другим релевантним информацијама у духу интегративног таксономског приступа.

Ово истраживање представља допринос идентификацији и опису криптичних врста сирфида. Засновано је на анализи великог броја узорака и врста, и конзистентним анализама. Даје увид у комплексност процеса специјације који је обликован различитим унутрашњим (генетичким) и спољашњим (срединским) факторима. Представља значајан допринос у процени укупног биодиверзитета осоликих мува. Конзервација постојећег биодиверзитета осоликих мува од посебног је значаја због интеракције коју ови инсекти остварују са биљкама кроз процес полинације. Утврђивање молекуларног диверзитета даје детаљнији увид у свеукупни биодиверзитет осоликих мува расветљавајући и његову скривену компоненту.



9. Литература

- Abbot, P. (2001) Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science*, 1(8): 1-3.
- Ačanski, J., Vujić, A., Djan, M., Obreht Vidaković, D., Ståhls, G. and Radenković, S. (2016) Defining species boundaries in the *Merodon avidus* complex (Diptera, Syrphidae) using integrative taxonomy, with the description of a new species. *European Journal of Taxonomy*, (237): 1-25. doi:<https://doi.org/10.5852/ejt.2016.237>
- 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.
- Andrić, A., Šikoparija, B., Obreht, D., Đan, M., Preradović, J., Radenković, S., Pérez-Banon, C. and Vujić, A., (2014) DNA barcoding applied: identifying the larva of *Merodon avidus* (Diptera: Syrphidae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, 54: 741-757.
- Azmeh, S., Owen, J., Sørensen, K., Grewcock, D. and Gilbert, F. (1998) Mimicry profiles are affected by human-induced habitat changes. *Proceedings The Royal Society London B*, 265: 2285-2290.
- Bailly-Bechet, M., Martins-Simões, P., Szöllösi, G.J., Mialdea, G., Sagot, M.F. and Charlat, S. (2017) How Long Does *Wolbachia* Remain on Board? *Molecular Biology and Evolution*, 34(5): 1183-1193.
- Baldo, L., Hotopp, J.C.D., Jolley, K.A., Bordenstein, S.R., Biber, S.A., Choudhury, R.R., Hayashi, C., Maiden, M.C., Tettelin, H. and Werren, J.H. (2006) Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11): 7098-7110.
- 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>)
- Barton, N. and Jones, J.S. (1983) Mitochondrial DNA: new clues about evolution. *Nature*, 306: 317-318.



- 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.
- Belshaw, R., Lopez-Vaamonde, C., Degerli, N. and 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. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2001.tb01370.x>
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K. and Das, I. (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(3): 148-155.
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R. and Abebe, E. (2005) Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462): 1935-1943.
- Blondel, J.J., Aronson, J., Bodiou, J.-Y. and Boeuf, G. (2010) *The Mediterranean Region: Biological Diversity in Space and Time*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Bordenstein, S.R., O'hara, F.P. and Werren, J.H. (2001) *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature*, 409(6821): 707-710.
- Chen, H., Rangasamy, M., Tan, S.Y., Wang, H. and Siegfried, B.D. (2010) Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS one*, 5: e11963. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011963>
- Chroni, A., Djan, M., Vidaković, D.O., Petanidou, T. and Vujić, A. (2017) Molecular species delimitation in the genus *Eumerus* (Diptera: Syrphidae). *Bulletin of entomological research*, 107(1): 126-138.
- Clement, M., Posada, D.C.K.A. and Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular ecology*, 9(10), 1657-1659.
- 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.



- Dayrat, B. (2005) Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85(3): 407-15.
- DeSalle, R., Egan, M.G. and Siddall, M. (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462): 1905-1916.
- Dušinský, R., Kúdela, M., Stloukalová, V. and Jedlička, L. (2006) Use of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for discrimination between and within species of blackflies (Diptera: Simuliidae). *Biologia*, 61(3): 299-304.
- Edmunds, M. (2008) Hoverflies: the garden mimics. *Biologist* 55(4): 202-207.
- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8): 2611-2620.
- Evison, S.E., Roberts, K.E., Laurenson, L., Pietravalle, S., Hui, J., Biesmeijer, J.C., Smith, J.E., Budge, G. and Hughes, W.O. (2012) Pervasiveness of parasites in pollinators. *PloS one*, 7(1): e30641.
- Excoffier, L. and Lischer, H.E. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Falush, D., Stephens, M. and Pritchard, J.K. (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Resources*, 7(4): 574-578.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and 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. and Milankov, V. (2011) Phenotypic evidence for hidden biodiversity in the *Merodon aureus* group (Diptera, Syrphidae) on the Balkan Peninsula: conservation implication. *Journal of Insect Conservation*, 15(3): 379-388. doi:10.1007/s10841-010-9311-5
- Frankham, R., Ballou, J.D. and Briscoe, D.A. (2004) *A primer of conservation genetics*. Cambridge University Press.



- Fujisawa, T. and Barraclough, T.G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic biology*, 62(5), 707-724.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S. and Hurst, G.D.D. (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, 18(22): 4541-4550. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x
- Glasel, J.A. (1995) Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*, 18(1): 62-63.
- 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.
- Goloboff, P.A. (1999) NONA computer program. Ver. 2.0. Tucuman, Argentina: Published by the author.
- Grković, A., Vujić, A., Radenković, S., Chroni, A. and Petanidou, T. (2015) Diversity of the genus *Eumerus* Meigen (Diptera, Syrphidae) on the eastern Mediterranean islands with description of three new species. *Annales de la Société entomologique de France (NS)*, 51(4): 361-373.
- Haarto, A. and 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: 93-134. doi:10.3897/zookeys.431.7207
- Hall, T.A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N. and Hickey D.A. (2007) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23(4): 167-172.
- Harrison, R.G. (1989) Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 4: 6-11.
- 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
- Herrera, M.S., Realpe, E. and Salazar, C. (2010) A neotropical polymorphic damselfly shows poor congruence between genetic and traditional morphological characters in Odonata. *Molecular phylogenetics and evolution*, 57(2): 912-917.
- Hewitt, G.M. (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological journal of the Linnean Society*, 58(3): 247-276. doi: 10.1006/bijl.1996.0035
- Hewitt, G.M. (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological journal of the Linnean Society*, 68(1-2): 87-112.
- Hewitt, G.M. (2011) Mediterranean peninsulas: the evolution of hotspots. In *Biodiversity hotspots* (pp. 123-147). Springer Berlin Heidelberg.
- Hill, G.E. (2015) Mitonuclear ecology. *Molecular biology and evolution*, 32(8): 1917-1927.
- Hillis, D.M. and Bull, J.J. (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic biology*, 42(2): 182-192.
- Holloway, G., Gilbert, F. and Brandt, A. (2002) The relationship between mimetic imperfection and phenotypic variation in insect colour patterns. *Proceedings The Royal Society London B*, 269: 411-416.
- Hubert, N. and Hanner, R. (2015) DNA Barcoding, species delineation and taxonomy: a historical perspective. *DNA Barcodes*, 3(1): 44-58.
- Hurkmans, W. (1993) A monograph of *Merodon* (Diptera: Syrphidae). Part 1. *Tijdschrift voor entomologie*, 136: 147-234.
- Hurst, G.D. and 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 of London B: Biological Sciences*, 272(1572): 1525-1534.



- Hwang, Ui-W. and Kim, W. (1999) General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology*, 37(4): 215-228.
- Jaenike, J., Dyer, K.A., Cornish, C. and Minhas, M.S. (2006) Asymmetrical reinforcement and *Wolbachia* infection in *Drosophila*. *PLoS Biology*, 4(10): e325.
- Jeyaprakash, A. and Hoy, M.A. (2000) Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology* 9: 393-405.
- Katoh, K. and Standley, D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4): 772-780.
- Kehlmaier, C. and Assmann, T. (2010) Molecular analysis meets morphology-based systematics—a synthetic approach for Chalarinae (Insecta: Diptera: Pipunculidae). *Systematic Entomology*, 35(1): 181-195.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Knowles, L.L. (2000) Tests of Pleistocene speciation in montane grasshoppers (genus *Melanoplus*) from the sky islands of western North America. *Evolution*, 54(4): 1337-1348. doi: 10.1111/j.0014-3820.2000.tb00566.x PMID: 1100530
- Kočiš Tubić N. (2014) Populaciono-genetička karakterizacija ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia* L.) južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana. Autorski reprint.
- Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A. and Mayrose, I. (2015) Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular ecology resources*, 15(5): 1179-1191.
- Koukou, K., Pavlikaki, H., Kiliyas, G., Werren, J.H., Bourtzis, K. and Alahiotis, S.N. (2006) Influence of antibiotic treatment and *Wolbachia* curing on sexual isolation among *Drosophila melanogaster* cage populations. *Evolution*, 60(1): 87-96.
- 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.



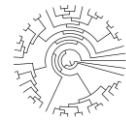
- Lee, C.E. and Frost, B.W. (2002) Morphological stasis in the *Eurytemora affinis* species complex (Copepoda: Temoridae). *Hydrobiologia*, 480(1): 111-128.
- Leigh, J.W. and Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9): 1110-1116.
- Librado, P. and Rozas, J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452. doi:<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Locke, M.M. and Skevington, J.H. (2013) Revision of Nearctic *Dasysyrphus* Enderlein (Diptera: Syrphidae). *Zootaxa*, 3660(1): 001-080.
- Luque, C., Legal, L., Staudter, H., Gers, C. and Wink, M. (2002) ISSR (inter simple sequence repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). *Hereditas*, 136(3): 251-253.
- Makarenkov, V., Kevorkov, D. and Legendre, P. (2006) Phylogenetic network construction approaches. *Applied mycology and biotechnology*, 6: 61-97.
- 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.
- Marcos-García, M.Á., Vujić, A., Ricarte, A. and 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.
- 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](https://doi.org/10.14411/eje.2006.059)
- Mayr, E. (1996) What is a species, and what is not? *Philosophy of Science*, 63(2): 262-277.
- Mengual, X., Ståhls, G. and Rojo, S. (2008a) First phylogeny of predatory flower flies (Diptera, Syrphidae, Syrphinae) using mitochondrial COI and nuclear 28S rRNA genes: conflict and congruence with the current tribal classification. *Cladistics*, 24(4): 543-562. doi:[10.1111/j.1096-0031.2008.00200.x](https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00200.x)



- Mengual, X., Ståhls, G. and Rojo, S. (2008b) 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. and 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. doi: 10.1111/cla.12105
- Mengual, X., Ståhls, G., Vujić, A. and Marcos-García, M. (2006) Integrative taxonomy of Iberian *Merodon* species (Diptera, Syrphidae). *Zootaxa*, 1377: 1-26.
- Milankov, V., Ludoški, J., Ståhls, G., Stamenković, J. and Vujić, A. (2009) High molecular and phenotypic diversity in the *Merodon avidus* complex (Diptera, Syrphidae): cryptic speciation in a diverse insect taxon. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 55(4): 819-833.
- Milankov, V., Ståhls, G., Stamenković, J. and Vujić, A. (2008a) Genetic diversity of populations of *Merodon aureus* and *M. cinereus* species complexes (Diptera, Syrphidae): integrative taxonomy and implications for conservation priorities on the Balkan Peninsula. *Conservation Genetics*, 9(5): 1125-1137. doi: 10.1007/s10592-007-9426-8
- Milankov, V., Ståhls, G. and Vujić, A. (2008b) Genetic characterization of the Balkan endemic species, *Merodon desuturinus* (Diptera: Syrphidae). *European Journal of Entomology*, 105(2): 197-204.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W. and Schwartz, T. (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 2010 Nov 14; New Orleans, LA., p. 1-8.
- 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.
- Moulton, J.K. and Wiegmann, B.M. (2004) Evolution and phylogenetic utility of CAD (rudimentary) among Mesozoic-aged Eremoneuran Diptera (Insecta). *Molecular phylogenetics and evolution*, 31(1): 363-378.
- Nedeljković, Z., Ačanski, J., Vujić, A., Obreht, D., Đan, M., Ståhls, G. and Radenković, S. (2013) Taxonomy of *Chrysotoxum festivum* Linnaeus, 1758 (Diptera: Syrphidae)-an integrative approach. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 169(1): 84-102.



- Nedeljković, Z., Ačanski, J., Đan, M., Obreht-Vidaković, D., Ricarte, A. and 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.
- Nedeljković, Z., Ricarte A., Šašić Zorić L., Đan M., Obreht Vidaković D. and Vujić A. The genus *Xanthogramma* Schiner, 1861 (Diptera: Syrphidae) in southeastern Europe, with descriptions of two new species. *The Canadian Entomologist*. (у штампи)
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. New York: Colombia University Press. 512 p.
- Nei, M. and Li W.H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10): 5269-5273.
- Nei, M. and Zhang, J., 2005. Evolutionary distance: estimation. eLS.
- Ng, W.L. and Tan, S.G. (2015) Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right. *ASM Science Journal*, 9(1): 30-39.
- Nixon, K.C. (2002) WinClada ver. 1.00. 08. Ithaca, New York: Published by the author.
- Oliveira, L.O.D., Venturini, B.A., Rossi, A.A.B. and Hastenreiter, S.S. (2010) Clonal diversity and conservation genetics of the medicinal plant *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). *Genetics and molecular biology*, 33(1): 86-93.
- Page, R.D.M. (1996) TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358.
- 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>
- Patwardhan, A., Ray, S. and Roy, A. (2014) Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *Journal of Phylogenetics and Evolutionary biology*, 2(2): 1-9. doi: [10.4172/2329-9002.1000131](https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000131)
- Pavlicek, A., Hrdá, S. and Flegr, J. (1999). Short Communication FreeTree-Freeware Program for Construction of Phylogenetic Trees on the Basis of Distance Data and Bootstrap/Jackknife Analysis of the Tree Robustness. Application in the RAPD Analysis of Genus *Frenkelia*. *Folia Biologica (Praba)*, 45: 97-99.



- Pérez-Bañón, C., Rojo, S., Ståhls, G. and Marcos-García, M.A. (2003) Taxonomy of European *Eristalinus* (Diptera: Syrphidae) based on larval morphology and molecular data. *European Journal of Entomology*, 100: 417-428. doi: [10.14411/eje.2003.064](https://doi.org/10.14411/eje.2003.064)
- Pires, A.C. and Marinoni, L. (2010) DNA barcoding and traditional taxonomy unified through integrative taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotropica*, 10: 339-346. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032010000200035>
- Popov, G.V. (2001) What and where are *Merodon* feeding? In: First international workshop on the Syrphidae. Staatliches Museum für Naturkunde, Stuttgart, Germany, pp. 28-29.
- Popović, D., Ačanski, J., Djan, M., Obreht, D., Vujić, A. and Radenković, S. (2015) Sibling species delimitation and nomenclature of the *Merodon avidus* complex (Diptera: Syrphidae). *European Journal of Entomology*, 112(4): 790-809. doi: [10.14411/eje.2015.100](https://doi.org/10.14411/eje.2015.100)
- Posada, D. and Crandall, K.A. (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in ecology and evolution*, 16(1): 37-45.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. and Achaz, G. (2012) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21: 1864-1877. doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x> PMID: 21883587
- Radenković, S., Šašić Zorić, L., Djan, M., Obreht Vidaković, D., Ačanski, J., Ståhls, G., Veličković, N., Markov, Z., Petanidou, T., Kočiš Tubić, N. and Vujić, A. (2018) Cryptic speciation in the *Merodon luteomaculatus* complex (Diptera: Syrphidae) from the eastern Mediterranean. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. doi: [10.1111/jzs.12193](https://doi.org/10.1111/jzs.12193)
- Radenković, S., Vujić, A., Ståhls, G., Pérez-Bañón, C., Petanidou, T. and Šimić, S. (2011) Three new cryptic species of the genus *Merodon* Meigen (Diptera: Syrphidae) from the island of Lesbos (Greece). *Zootaxa*, 2735: 35-56.
- Ratnasingham, S. and Hebert, P.D. (2013). A DNA-based registry for all animal species: The Barcode Index Number (BIN) system. *PloS one*, 8(7), e66213.
- Raupach, M.J., Astrin, J.J., Hannig, K., Peters, M.K., Stoeckle, M.Y. and Wägele, J.W. (2010) Molecular species identification of Central European ground beetles (Coleoptera: Carabidae) using nuclear rDNA expansion segments and DNA barcodes. *Frontiers in Zoology*, 7(26): 1-15.



- Rand, D.M., Haney, R.A. and Fry, A.J. (2004) Cytonuclear coevolution: the genomics of cooperation. *Trends in ecology and evolution*, 19(12): 645-653.
- Reemer, M. and Ståhls, G. (2013) Phylogenetic relationships of Microdontinae (Diptera: Syrphidae) based on molecular and morphological characters. *Systematic Entomology*, 38(4): 661-688.
- 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.
- 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
- Rotheray, G.E. and Gilbert, F. (2011). The natural history of hoverflies. Cardigan: Forrest textŠašić, L., Ačanski, J., Vujić, A., Ståhls, G., Radenković, S., Milić, D., Vidaković, D.O. and Đan, M., (2016) Molecular and morphological inference of three cryptic species within the *Merodon aureus* species group (Diptera: Syrphidae). *PloS one*, 11(8): p.e0160001.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Sambrook J.F. and Russel D.W. (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3rd Edition. Cold Laboratory Press, USA.
- Savić, I.R. (2008) Diversification of the Balkan fauna: its origin, historical development and present status. *Advances in Arachnology and Developmental Biology*, 12: 57-78.
- 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.
- Schmitt, T. (2007) Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology*, 4(1): 11.
- Schönrogge, K., Barr, B., Wardlaw, J.C., Napper, E., Gardner, M.G., Breen, J., Elmes, G.W. and Thomas, J.A. (2002) When rare species become endangered: cryptic speciation in myrmecophilous hoverflies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 75(3): 291-300.



- Sheffield, C.S., Hebert, P.D., Kevan, P.G. and Packer, L. (2009) DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. *Molecular Ecology Resources*, 9(s1): 196-207.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. and 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. doi:<http://dx.doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>
- Sintupachee, S., Milne, J.R., Poonchaisri, S., Baimai, V. and Kittayapong, P. (2006) Closely related *Wolbachia* strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant. *Microbial ecology*, 51(3): 294-301.
- Skevington, J.H., Yeates, D.K. (2000) Phylogeny of the Syrphoidea (Diptera) inferred from mtDNA sequences and morphology with particular reference to classification of the Pipunculidae (Diptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16(2): 212-24.
- Speight, M.C.D. (2014) Species accounts of European Syrphidae (Diptera), 2014. In: Speight MCD, Castella E, Sarthou JP, Vanappelghem C, editors. Syrph the Net, the database of European Syrphidae. Vol.78. Dublin: Syrph the Net publications.
- Ståhls, G., Hippa, H., Rotheray, G., Muona, J. and Gilbert, F. (2003) Phylogeny of Syrphidae (Diptera) inferred from combined analysis of molecular and morphological characters. *Systematic Entomology*, 28: 433-450.
- Ståhls, G. and 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., Vujić, A. and Milankov, V. (2008) *Cheilosia vernalis* (Diptera, Syrphidae) complex: molecular and morphological variability. *Annales Zoologici Fennici*, 45(2): 149-159.
- Ståhls, G., Vujić, A., Pérez-Bañon, C., Radenković, S., Rojo, S. and Petanidou, T. (2009) COI barcodes for identification of *Merodon* hoverflies (Diptera, Syrphidae) of Lesvos Island, Greece. *Molecular Ecology Resources*, 9(6): 1431-1438. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02592.x



- Ståhls, G., Vujić, A., Petanidou, T., Cardoso, P., Radenković, S., Ačanski, J., Pérez Bañón, C. and Rojo, S. (2016) Phylogeographic patterns of *Merodon* hoverflies in the Eastern Mediterranean region: revealing connections and barriers. *Ecology and Evolution*, 6(7): 2226-2245.
- Stamatakis, A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 21: btu033. Available on: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2014/01/21/bioinformatics.btu033.abstract>.
- Stephenson, F.H. (2010) *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in the Laboratory*, 2nd edition. Academic Press.
- Stewart, J.R., Lister, A.M., Barnes, I. and Dalén, L. (2010) Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277(1682): 661-671.
- Surzycki, S. (2000) General aspects of DNA isolation and purification. In *Basic Techniques in Molecular Biology* (pp. 1-32). Springer Berlin Heidelberg.
- Telschow, A., Flor, M., Kobayashi, Y., Hammerstein, P. and Werren, J.H. (2007) *Wolbachia*-induced unidirectional cytoplasmic incompatibility and speciation: mainland-island model. *PLoS One*, 2(8): e701.
- Tamura, K. (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 678-687.
- Tamura, K. and Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512-526.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A. and Sing, C.F. (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132(2): 619-633.



- Thompson, F.C. and Rotheray, G.E. (1998) Family Syrphidae. In: Papp L, Darvas B, editors. *Contributions to a manual of Palaearctic Diptera (with special reference to flies of economic importance)*. Vol. 3. Budapest: Science Herald. pp. 81-139.
- Thompson, F.C., Vockeroth, J.R. and Sedman, Y.S. (1976) Family Syrphidae. *A catalogue of the Americas South of the United States*. Vol. 46. Museu de Zoologia, Universidade de Sao Paulo, São Paulo, 195 pp.
- Thormann, B., Raupach, M. J., Wagner, T., Wägele, J. W. and Peters, M. K. (2011) Testing a short nuclear marker for inferring staphylinid beetle diversity in an African tropical rain forest. *PLoS one*, 6(3): e18101.
- Veselić, S., Vujić, A. and Radenković, S. (2017) Three new Eastern-Mediterranean endemic species of the *Merodon aureus* group (Diptera: Syrphidae). *Zootaxa*, 4254(4): 401-434.
- Vujić, A., Radenković, S., Ačanski, J., Grković, A., Taylor, M., Şenol, S.G. and Hayat, R. (2015) Revision of the species of the *Merodon nanus* group (Diptera: Syrphidae) including three new species. *Zootaxa*, 4006(3): 439-462.
- Vujić, A., Šimić, S. and Radenković, S. (2002) New data about hoverflies diversity (Insecta: Diptera: Syrphidae) on the mountain Fruška gora (Serbia), *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, (103): 91- 106, UDK: 595.773.1(497.113), ISSN 0352-4906.
- Vujić, A., Pérez-Bañón, C., Radenković, S., Ståhls, G., Rojo, S., Petanidou, T. and 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. doi: [10.1080/00379271.2007.10697527](https://doi.org/10.1080/00379271.2007.10697527)
- Vujić, A., Petanidou, T., Tscheulin, T., Cardoso, P., Radenković, S., Ståhls, G., Baturan, Ž., Mijatović, G., Rojo, S., Pérez-Bañón, C. and Devalez, J. (2016) Biogeographical patterns of the genus *Merodon* Meigen, 1803 (Diptera: Syrphidae) in islands of the eastern Mediterranean and adjacent mainland. *Insect Conservation and Diversity*, 9: 181-191. doi:<http://dx.doi.org/10.1111/icad.12156>
- Vujić, A., Radenković, S., Ståhls, G., Ačanski, J., Stefanović, A., Veselić, S., Andrić, A. and Hayat, R. (2012) Systematics and taxonomy of the *ruficornis* group of genus *Merodon* Meigen (Diptera: Syrphidae). *Systematic Entomology*, 37: 578-602. doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3113.2012.00631.x>



- Vujić, A., Ståhls, G., Ačanski, J., Bartsch, H., Bygebjerg, R. and Stefanović, A. (2013) Systematics of Pipizini and taxonomy of European *Pipiza* Fallén: molecular and morphological evidence (Diptera, Syrphidae). *Zoologica Scripta*, 42(3): 288-305.
- Vujić, A., Ståhls, G., Ačanski, J., Rojo, S., Pérez-Bañón, C. and Radenković, S. (2018) Review of the *Merodon albifasciatus* Macquart species complex (Diptera: Syrphidae): the nomenclatural type located and its provenance discussed. *Zootaxa*, 4374(1): 25-48.
- Werren, J.H. (1998) *Wolbachia* and speciation. In: Howard D.J. and Berlocher S.H (eds.), *Endless forms: species and speciation*. Oxford University Press, New York. pp. 245-260.
- Werren, J.H., Baldo, L. and Clark, M.E. (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10): 741-751.
- 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, J.H., Zhang, W. and Guo, L.R. (1995) Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 261(1360): 55-63.
- Yang, Z. and Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews Genetics*, 13(5): 303-314.
- 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.
- Yeh, W.B., Chang, Y.L., Lin, C.H., Wu, F.S. and Yang, J.T. (2004) Genetic differentiation of *Loxoblemmus appendicularis* complex (Orthoptera: Gryllidae): speciation through vicariant and glaciation events. *Annals of the Entomological Society of America*, 97: 613-623. doi:[https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2004\)097\[0613:GDOLAC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2004)097[0613:GDOLAC]2.0.CO;2)
- Zhou, W., Rousset, F. and O'Neill, S. (1998) Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265(1395): 509-515.



10. Прилози

10.1. Прилог 1

Табела П1. Списак узорака *Merodon aureus* групе са локалитетима узорковања. / Table P1. List of specimens of *Merodon aureus* group with sampling localities.

Код ID	ДНК код DNA ID	COI Нар	Подгрупа Subgroup	Комплекс Complex	Врста Species	Пол Gender	Држава State	Локалитет Locality
07223	AU324	Нар299		<i>unguicornis</i>	<i>unguicornis</i>	♀	Шпанија / Spain13	Сјера Невада / Siera Nevada
07297	AU325	Нар300		<i>unguicornis</i>	<i>unguicornis</i>	♀	Шпанија / Spain2	Сјера Невада / Siera Nevada
07291	AU326	Нар301		<i>unguicornis</i>	<i>unguicornis</i>	♀	Шпанија / Spain2	Сјера Невада / Siera Nevada
07284	AU327	Нар301		<i>unguicornis</i>	<i>unguicornis</i>	♀	Шпанија / Spain2	Сјера Невада / Siera Nevada
07277	AU328	Нар300		<i>unguicornis</i>	<i>unguicornis</i>	♂	Шпанија / Spain2	Сјера Невада / Siera Nevada
07271	AU330	Нар302		<i>unguicornis</i>	<i>unguicornis</i>	♀	Шпанија / Spain2	Сјера Невада / Siera Nevada
LJ84	AU162	Нар1	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Италија / Italy1	Балино / Ballino
LJ85	AU163	Нар2	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Италија / Italy1	Балино / Ballino
LJ86	AU164	Нар3	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Италија / Italy1	Балино / Ballino
G1667	AU169	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
G1668	AU170	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
LJ71	AU371	Нар3	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Италија / Italy1	Балино / Ballino
LJ72	AU372	Нар3	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Италија / Italy1	Балино / Ballino
LJ74	AU373	Нар3	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♀	Италија / Italy1	Балино / Ballino
G0974	AU374	Нар13	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Италија / Italy2	Перугија / Perugia
G0977	AU375	Нар14	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Италија / Italy2	Перугија / Perugia
06026	MS90	Нар42	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Швајцарска / Switzerland2	Валаис / Valais
06021	MS91	Нар43	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Француска / France7	Алпи / Alps
06028	MS92	Нар42	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♀	Швајцарска / Switzerland2	Валаис / Valais
Y15	AU660	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Србија / Serbia1	Копаоник / Кораоник
Y19	AU662	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♀	Србија / Serbia1	Копаоник / Кораоник
Y20	AU663	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♀	Србија / Serbia1	Копаоник / Кораоник
Y22	AU664	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♀	Србија / Serbia1	Копаоник / Кораоник
Y23	AU665	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Србија / Serbia1	Копаоник / Кораоник
Y24	AU666	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Србија / Serbia1	Копаоник / Кораоник
Y25	AU667	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Србија / Serbia1	Копаоник / Кораоник
Y26	AU668	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Србија / Serbia1	Копаоник / Кораоник
Y27	AU669	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Србија / Serbia1	Копаоник / Кораоник

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

U77	AU670	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Србија / Serbia2/Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
U78	AU671	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
U79	AU695	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
U80	AU696	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
U81	AU697	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
U82	AU698	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
U83	AU699	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
U84	AU700	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
LJ75	AU706	Нар3	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Италија / Italy1	Балино / Ballino
LJ76	AU707	Нар3	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Италија / Italy1	Балино / Ballino
LJ77	AU708	Нар2	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Италија / Italy1	Балино / Ballino
T83	AU709	Нар19	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Италија / Italy12	Апуанске пл. / Apuane Mts.
T84	AU710	Нар6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♀	Италија / Italy12	Апуанске пл. / Apuane Mts.
LJ78	AU838	Нар3	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Италија / Italy1	Балино / Ballino
LJ79	AU839	Нар3	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♀	Италија / Italy1	Балино / Ballino
LJ80	AU840	Нар3	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Италија / Italy1	Балино / Ballino
LJ81	AU841	Нар3	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♀	Италија / Italy1	Балино / Ballino
LJ82	AU842	Нар2	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♀	Италија / Italy1	Балино / Ballino
LJ83	AU843	Нар3	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Италија / Italy1	Балино / Ballino
LJ87	AU844	Нар38	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Италија / Italy1	Балино / Ballino
LJ88	AU845	Нар2	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Италија / Italy1	Балино / Ballino
X50	AU814	Нар35	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Црна Гора / Montenegro2	Дурмитор / Durmitor
A81	AU701	Нар10	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
A82	AU702	Нар17	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
A84	AU703	Нар18	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
A85	AU704	Нар10	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
G57	AU705	Нар10	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
AI82	AU711	Нар4	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece1	Мега Рема / Mega Rema
AI78	AU712	Нар4	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece1	Мега Рема / Mega Rema
AI74	AU713	Нар20	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece1	Мега Рема / Mega Rema
AI76	AU714	Нар4	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece1	Мега Рема / Mega Rema
AI81	AU715	Нар21	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece1	Мега Рема / Mega Rema
AI84	AU716	Нар4	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece1	Мега Рема / Mega Rema
AI85	AU717	Нар4	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece1	Мега Рема / Mega Rema

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

AI86	AU718	Hap22	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece1	Мега Рема / Mega Rema
06613	AU719	Hap23	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece2	Пелопонез / Peloponnese
06524	AU720	Hap24	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece3	Пелопонез / Peloponnese
06523	AU721	Hap25	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece3	Пелопонез / Peloponnese
06534	AU722	Hap26	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece4	Пелопонез / Peloponnese
06580	AU723	Hap27	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece4	Пелопонез / Peloponnese
06581	AU724	Hap28	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece4	Пелопонез / Peloponnese
I5	AU725	Hap7	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece5	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
I10	AU726	Hap29	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece5	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
06498	AU727	Hap9	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece47	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
06509	AU728	Hap8	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece48	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
06515	AU729	Hap30	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece49	Ламија / Lamia
06513	AU730	Hap31	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece49	Ламија / Lamia
H63	AU731	Hap32	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece50	Пл. Пиндос / Mtn. Pindos
H62	AU732	Hap33	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece50	Пл. Пиндос / Mtn. Pindos
H55	AU733	Hap34	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece51	Пл. Пиндос / Mtn. Pindos
G0243	AU816	Hap36	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Црна Гора / Montenegro3	Румија / Rumija
B4	AU817	Hap12	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
A99	AU818	Hap12	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
A98	AU819	Hap12	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
J58	AU820	Hap12	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Црна Гора / Montenegro4	Орјен / Orjen
J23	AU821	Hap12	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Црна Гора / Montenegro4	Орјен / Orjen
J88	AU822	Hap12	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Црна Гора / Montenegro5	Орјен / Orjen
J94	AU823	Hap12	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Црна Гора / Montenegro5	Орјен / Orjen
06609	AU846	Hap39	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece2	Пелопонез / Peloponnese
06600	AU847	Hap23	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece2	Пелопонез / Peloponnese
06599	AU848	Hap40	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece2	Пелопонез / Peloponnese
06590	AU849	Hap23	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece52	Пелопонез / Peloponnese
06606	AU850	Hap40	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece2	Пелопонез / Peloponnese
06688	AU851	Hap24	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece53	Пелопонез / Peloponnese
06462	AU852	Hap24	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece53	Пелопонез / Peloponnese
06464	AU853	Hap27	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece53	Пелопонез / Peloponnese
06461	AU854	Hap24	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece45	Пелопонез / Peloponnese
06647	AU855	Hap27	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece54	Пелопонез / Peloponnese

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

06648	AU856	Hap27	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece54	Пелопонез / Peloponnese
06649	AU857	Hap23	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece54	Пелопонез / Peloponnese
06639	AU858	Hap27	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece54	Пелопонез / Peloponnese
06644	AU859	Hap41	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece54	Пелопонез / Peloponnese
06528	AU860	Hap27	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece3	Пелопонез / Peloponnese
AK56	AU165	Hap4	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece1	Мега Рема / Mega Rema
AL70	AU166	Hap5	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece1	Мега Рема / Mega Rema
H85	AU171	Hap7	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece5	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
H84	AU172	Hap8	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece5	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
H91	AU173	Hap9	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece5	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
I2	AU174	Hap8	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece5	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
G65	AU363	Hap10	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
G82	AU364	Hap10	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
G85	AU365	Hap10	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
G87	AU366	Hap10	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
G88	AU367	Hap10	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
J81	AU369	Hap11	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♀	Црна Гора / Montenegro6	Орјен / Orjen
J83	AU370	Hap12	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	♂	Црна Гора / Montenegro6	Орјен / Orjen
09606	AU828	Hap37	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♀	Швајцарска / Switzerland1	Валаис / Valais
09613	AU830	Hap37	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Швајцарска / Switzerland1	Валаис / Valais
09624	AU831	Hap37	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Швајцарска / Switzerland1	Валаис / Valais
09626	AU832	Hap6	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Швајцарска / Switzerland1	Валаис / Valais
09628	AU833	Hap37	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Швајцарска / Switzerland1	Валаис / Valais
09629	AU834	Hap37	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Швајцарска / Switzerland1	Валаис / Valais
09528	AU835	Hap37	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Швајцарска / Switzerland1	Валаис / Valais
09529	AU836	Hap37	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Швајцарска / Switzerland1	Валаис / Valais
09530	AU837	Hap37	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	♂	Швајцарска / Switzerland1	Валаис / Valais
10288	AU485	Hap15	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>ortus</i> sp. n.	♀	Иран / Iran1	Кара Даг / Kara Dag
10291	AU486	Hap16	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>ortus</i> sp. n.	♂	Иран / Iran2	Кара Даг / Kara Dag
10287	AU487	Hap15	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>ortus</i> sp. n.	♂	Иран / Iran3	Кара Даг / Kara Dag
10267	AU488	Hap15	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>ortus</i> sp. n.	♂	Иран / Iran4	Кара Даг / Kara Dag
07260	AU317	Hap44	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>unicolor</i>	♂	Шпанија / Spain1	Сјера Невада / Siera Nevada
07261	AU318	Hap45	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>unicolor</i>	♂	Шпанија / Spain1	Сјера Невада / Siera Nevada
07267	AU319	Hap46	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>unicolor</i>	♂	Шпанија / Spain1	Сјера Невада / Siera Nevada

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

07273	AU320	Hap46	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>unicolor</i>	♀	Шпанија / Spain2	Сјера Невада / Siera Nevada
07274	AU321	Hap47	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>unicolor</i>	♀	Шпанија / Spain2	Сјера Невада / Siera Nevada
07280	AU322	Hap48	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>unicolor</i>	♀	Шпанија / Spain2	Сјера Невада / Siera Nevada
07288	AU323	Hap46	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>unicolor</i>	♂	Шпанија / Spain2	Сјера Невада / Siera Nevada
09931	AU794	Hap49	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>albidus</i> sp. n.	♀	Турска / Turkey1	Испарта / Isparta
09932	AU795	Hap49	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>albidus</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey1	Испарта / Isparta
09933	AU796	Hap50	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>albidus</i> sp. n.	♀	Турска / Turkey1	Испарта / Isparta
09934	AU797	Hap49	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>albidus</i> sp. n.	♀	Турска / Turkey1	Испарта / Isparta
09935	AU798	Hap49	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>albidus</i> sp. n.	♀	Турска / Turkey1	Испарта / Isparta
09936	AU799	Hap49	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>albidus</i> sp. n.	♀	Турска / Turkey1	Испарта / Isparta
09937	AU800	Hap49	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>albidus</i> sp. n.	♀	Турска / Turkey4	Бурдур / Burdur
09938	AU801	Hap49	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>albidus</i> sp. n.	♀	Турска / Turkey5	Испарта / Isparta
09939	AU802	Hap49	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>albidus</i> sp. n.	♀	Турска / Turkey6	Испарта / Isparta
09940	AU803	Hap49	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>albidus</i> sp. n.	♀	Турска / Turkey6	Испарта / Isparta
Đ22	AU253	Hap297			<i>pumilus</i>	♀	Мароко / Morocco1	Пл. де Бени-Снасен / Mtn. de Beni- Snassen
Đ23	AU254	Hap298			<i>pumilus</i>	♂	Мароко / Morocco1	Пл. де Бени-Снасен / Mtn. de Beni- Snassen
09364	AU742	Hap287			<i>pumilus</i>	♂	Шпанија / Spain3	Кала/Kala
09366	AU743	Hap288			<i>pumilus</i>	♂	Шпанија / Spain3	Кала/Kala
09433	AU744	Hap289			<i>pumilus</i>	♂	Шпанија / Spain4	Болоња / Bologna
09437	AU745	Hap290			<i>pumilus</i>	♂	Шпанија / Spain4	Болоња / Bologna
09439	AU746	Hap291			<i>pumilus</i>	♂	Шпанија / Spain4	Болоња / Bologna
09438	AU747	Hap292			<i>pumilus</i>	♀	Шпанија / Spain4	Болоња / Bologna
09446	AU748	Hap293			<i>pumilus</i>	♀	Шпанија / Spain4	Болоња / Bologna
09448	AU749	Hap294			<i>pumilus</i>	♀	Шпанија / Spain4	Болоња / Bologna
09449	AU750	Hap295			<i>pumilus</i>	♀	Шпанија / Spain4	Болоња / Bologna
09451	AU751	Hap296			<i>pumilus</i>	♀	Шпанија / Spain4	Болоња / Bologna
08060	AU458	Hap176	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey2	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08059	AU459	Hap177	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey2	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08066	AU460	Hap177	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey2	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08067	AU461	Hap176	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey2	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08068	AU462	Hap176	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey2	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08069	AU463	Hap177	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey2	Пл. Давраз / Mtn. Davraz

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

08070	AU464	Hap177	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey2	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08071	AU465	Hap177	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey2	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08078	AU467	Hap177	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♀	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08076	AU469	Hap176	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08077	AU470	Hap176	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08074	AU471	Hap176	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08080	AU472	Hap178	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08081	AU473	Hap176	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08084	AU474	Hap176	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08087	AU475	Hap177	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08088	AU476	Hap177	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08090	AU477	Hap179	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08094	AU478	Hap176	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08101	AU479	Hap177	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08708	AU480	Hap180	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey7	Мугла / Mugla
08709	AU481	Hap181	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey7	Мугла / Mugla
AD39	AU30	Hap158	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♂	Грчка / Greece6	Еврос
G2319	AU52	Hap182	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♂	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
G2320	AU53	Hap182	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♂	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
G2321	AU54	Hap182	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♂	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
G1911	AU55	Hap182	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♂	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
G1922	AU56	Hap182	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♂	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
G1923	AU57	Hap182	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♂	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
G1939	AU58	Hap182	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♂	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
G1955	AU59	Hap182	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♀	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
G1925	AU60	Hap182	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♀	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
G1932	AU61	Hap183	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♀	Србија / Serbia3	Ђердап / Đerdap
T35	AU62	Hap158	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♂	Грчка / Greece7/8	Еврос / Evros
T33	AU63	Hap158	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♂	Грчка / Greece7/8	Еврос / Evros
T30	AU64	Hap158	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♂	Грчка / Greece7/8	Еврос / Evros
T20	AU65	Hap158	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♂	Грчка / Greece7/8	Еврос / Evros
T36	AU66	Hap158	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♂	Грчка / Greece7/8	Еврос / Evros
T39	AU68	Hap185	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♀	Грчка / Greece7/8	Еврос / Evros
T23	AU69	Hap158	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♀	Грчка / Greece7/8	Еврос / Evros

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

T28	AU70	Hap158	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	♀	Грчка / Greece7/8	Еврос / Evros
08480	AU449	Hap175	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	♂	Турска / Turkey8	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08481	AU450	Hap175	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	♀	Турска / Turkey8	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08483	AU452	Hap175	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	♂	Турска / Turkey9	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08484	AU453	Hap175	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	♀	Турска / Turkey9	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08485	AU454	Hap175	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	♀	Турска / Turkey9	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08486	AU455	Hap175	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	♀	Турска / Turkey9	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08488	AU457	Hap175	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	♀	Турска / Turkey10	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
T32	AU67	Hap184	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece7/8	Еврос / Evros
T22	AU71	Hap186	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece7/8	Еврос / Evros
G2401	AU72	Hap187	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♂	Бугарска / Bulgaria1	Пирин / Pirini
G2402	AU73	Hap188	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia4	Пчиња / Pčinja
G2403	AU74	Hap189	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia4	Пчиња / Pčinja
G2404	AU75	Hap190	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia4	Пчиња / Pčinja
G2405	AU76	Hap191	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia4	Пчиња / Pčinja
G2407	AU77	Hap189	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia4	Пчиња / Pčinja
G2408	AU78	Hap192	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece7/8	Еврос / Evros
G2409	AU79	Hap193	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece7/8	Еврос / Evros
G2410	AU80	Hap194	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia5	Копаоник / Kopaonik
G2412	AU82	Hap194	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia5	Копаоник / Kopaonik
G2413	AU83	Hap194	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia5	Копаоник / Kopaonik
AE24	AU84	Hap194	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia5	Копаоник / Kopaonik
G2419	AU85	Hap195	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece9	Пл. Пиндос / Mtn. Pindos
G2417	AU86	Hap196	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece9	Пл. Пиндос / Mtn. Pindos
G2418	AU87	Hap195	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece9	Пл. Пиндос / Mtn. Pindos
G2416	AU88	Hap195	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece9	Пл. Пиндос / Mtn. Pindos
G2420	AU89	Hap197	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece9	Пл. Пиндос / Mtn. Pindos
AG31	AU90	Hap189	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia6	Стара Пл. / Stara Mtn.
AG35	AU91	Hap189	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia6	Стара Пл. / Stara Mtn.
AG39	AU92	Hap198	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia6	Стара Пл. / Stara Mtn.
AG36	AU93	Hap199	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia6	Стара Пл. / Stara Mtn.
AG34	AU94	Hap200	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia6	Стара Пл. / Stara Mtn.
AJ7	AU100	Hap158	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>bozdagensis</i> sp. n.	♀	Турска / Turkey11	Боздаг Пл. / Bozdag Mtn.

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

08681	AU425	Hap158	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>bozdagensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey12	Боздаг Пл. / Bozdag Mtn.
08683	AU426	Hap168	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>bozdagensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey12	Боздаг Пл. / Bozdag Mtn.
08025	AU438	Hap158	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>bozdagensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey13	Армуталани / Armutalani
AJ48	AU95	Hap201	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>bozdagensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey14	Боздаг Пл. / Bozdag Mtn.
AJ45	AU96	Hap185	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>bozdagensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey14	Боздаг Пл. / Bozdag Mtn.
AI93	AU97	Hap185	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>bozdagensis</i> sp. n.	♀	Турска / Turkey11	Боздаг Пл. / Bozdag Mtn.
AI94	AU98	Hap202	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>bozdagensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey11	Боздаг Пл. / Bozdag Mtn.
AJ9	AU99	Hap158	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>bozdagensis</i> sp. n.	♂	Турска / Turkey11	Боздаг Пл. / Bozdag Mtn.
05377	AU132	Hap167	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>cyprensis</i> sp. n.	♂	Кипар / Cyprus1	Кипар / Cyprus
05353	AU133	Hap167	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>cyprensis</i> sp. n.	♂	Кипар / Cyprus1	Кипар / Cyprus
05392	AU134	Hap167	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>cyprensis</i> sp. n.	♂	Кипар / Cyprus1	Кипар / Cyprus
05251	AU135	Hap167	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>cyprensis</i> sp. n.	♂	Кипар / Cyprus1	Кипар / Cyprus
05267	AU136	Hap167	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>cyprensis</i> sp. n.	♀	Кипар / Cyprus1	Кипар / Cyprus
05280	AU137	Hap167	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>cyprensis</i> sp. n.	♂	Кипар / Cyprus1	Кипар / Cyprus
05232	AU138	Hap167	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>cyprensis</i> sp. n.	♀	Кипар / Cyprus1	Кипар / Cyprus
05273	AU139	Hap167	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>cyprensis</i> sp. n.	♀	Кипар / Cyprus1	Кипар / Cyprus
05297	AU140	Hap167	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>cyprensis</i> sp. n.	♀	Кипар / Cyprus1	Кипар / Cyprus
05272	AU141	Hap167	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>cyprensis</i> sp. n.	♂	Кипар / Cyprus1	Кипар / Cyprus
08028	AU427	Hap169	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey10	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08011	AU428	Hap170	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey9	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08015	AU429	Hap171	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey9	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08023	AU430	Hap169	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey9	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08026	AU431	Hap172	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♀	Турска / Turkey8	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08035	AU432	Hap169	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♀	Турска / Turkey15	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08036	AU433	Hap170	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♀	Турска / Turkey15	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08037	AU434	Hap169	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♀	Турска / Turkey15	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08038	AU435	Hap173	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♀	Турска / Turkey15	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08039	AU436	Hap169	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♀	Турска / Turkey10	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08040	AU437	Hap173	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♀	Турска / Turkey10	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08029	AU440	Hap162	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08030	AU441	Hap166	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08031	AU442	Hap162	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08032	AU443	Hap174	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

08033	AU444	Hap162	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08034	AU445	Hap162	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08041	AU446	Hap165	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08063	AU447	Hap165	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08062	AU448	Hap169	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey10	Јенисарбадемли / Yenisarbademli
08055	AU1231f	Hap159	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey16	Меркез / Merkez
08054	AU1232f	Hap160	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey16	Меркез / Merkez
08053	AU1233f	Hap160	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey16	Меркез / Merkez
08056	AU1234f	Hap161	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08061	AU1235f	Hap162	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08065	AU1236f	Hap162	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08050	AU1237f	Hap163	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08051	AU1238f	Hap162	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08052	AU1239f	Hap164	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08064	AU1240f	Hap165	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08058	AU1241f	Hap162	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08042	AU1242f	Hap162	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08044	AU1243f	Hap162	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
08057	AU1244f	Hap166	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	♂	Турска / Turkey3	Пл. Давраз / Mtn. Davraz
10683	AU1414	Hap268	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♂	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10684	AU1415	Hap269	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♂	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10685	AU1416	Hap270	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♂	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10686	AU1417	Hap271	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♂	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10687	AU1418	Hap272	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♂	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10688	AU1419	Hap273	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♀	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10689	AU1420	Hap274	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♀	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10690	AU1421	Hap275	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♀	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10691	AU1422	Hap276	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♀	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10692	AU1423	Hap277	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♀	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10693	AU1424	Hap278	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♀	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10694	AU1425	Hap279	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♀	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10695	AU1426	Hap280	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♀	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10696	AU1427	Hap281	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♀	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10697	AU1428	Hap282	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♀	Грчка / Greece10	Крит / Crete

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

10699	AU1430	Hap283	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♀	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10700	AU1431	Hap284	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♀	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10701	AU1432	Hap274	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♀	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10702	AU1433	Hap285	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♂	Грчка / Greece10	Крит / Crete
10703	AU1434	Hap274	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♀	Грчка / Greece10	Крит / Crete
G2516	AU101	Hap286	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	♂	Грчка / Greece11	Родос / Rhodes
G2452	AU10	Hap226	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♀	Грчка / Greece12	Магнисиас / Magnisias
G2453	AU11	Hap227	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♂	Грчка / Greece13	Атики / Atiki
G2454	AU12	Hap228	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>androites</i>	♀	Грчка / Greece14	Андрос / Andros
G2456	AU13	Hap228	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>androites</i>	♀	Грчка / Greece15	Андрос / Andros
G2457	AU14	Hap228	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>androites</i>	♂	Грчка / Greece15	Андрос / Andros
G2460	AU15	Hap228	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>androites</i>	♂	Грчка / Greece15	Андрос / Andros
G2462	AU405	Hap228	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>androites</i>	♀	Грчка / Greece15	Андрос / Andros
G2464	AU406	Hap228	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>androites</i>	♀	Грчка / Greece16	Андрос / Andros
G2466	AU407	Hap247	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>androites</i>	♀	Грчка / Greece17	Андрос / Andros
G2459	AU408	Hap248	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>androites</i>	♀	Грчка / Greece15	Андрос / Andros
G2465	AU504	Hap250	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>androites</i>	♀	Грчка / Greece18	Андрос / Andros
G2455	AU505	Hap228	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>androites</i>	♂	Грчка / Greece15	Андрос / Andros
G2458	AU506	Hap249	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>androites</i>	♀	Грчка / Greece15	Андрос / Andros
G2468	AU16	Hap229	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♀	Србија / Serbia4	Пчиња / Pčinja
G2467	AU17	Hap230	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♂	Србија / Serbia4	Пчиња / Pčinja
G2469	AU18	Hap226	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♀	Србија / Serbia4	Пчиња / Pčinja
G2470	AU19	Hap231	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♀	Србија / Serbia4	Пчиња / Pčinja
LJ99	AU20	Hap188	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♂	Грчка / Greece6	Еврос / Evros
AB1	AU21	Hap188	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♂	Грчка / Greece19	Еврос / Evros
AC85	AU22	Hap231	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♂	Грчка / Greece20	Еврос / Evros
AC83	AU23	Hap232	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♀	Грчка / Greece21	Еврос / Evros
AC80	AU24	Hap188	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♀	Грчка / Greece20	Еврос / Evros
AC63	AU25	Hap231	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♀	Грчка / Greece22	Еврос / Evros
AC58	AU26	Hap233	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♀	Грчка / Greece23	Еврос / Evros
AC57	AU27	Hap231	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♀	Грчка / Greece24	Еврос / Evros
AC54	AU28	Hap188	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♂	Грчка / Greece25	Еврос / Evros
G2451	AU09	Hap225	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♂	Грчка / Greece26	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
AD29	AU31	Hap188	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♂	Грчка / Greece27	Еврос / Evros

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

08540	AU377	Hap235	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♂	Грчка / Greece28	Ахаја / Achaea
08543	AU378	Hap236	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♂	Грчка / Greece28	Ахаја / Achaea
08559	AU379	Hap235	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♂	Грчка / Greece28	Ахаја / Achaea
08561	AU380	Hap237	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♀	Грчка / Greece28	Ахаја / Achaea
08558	AU381	Hap238	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♀	Грчка / Greece28	Ахаја / Achaea
08541	AU382	Hap239	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♀	Грчка / Greece28	Ахаја / Achaea
08553	AU383	Hap235	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♀	Грчка / Greece28	Ахаја / Achaea
08556	AU384	Hap240	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♀	Грчка / Greece28	Ахаја / Achaea
08569	AU385	Hap241	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	♀	Грчка / Greece28	Ахаја / Achaea
G2427	AU02	Hap210	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>erymanthius</i>	♂	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2436	AU03	Hap211	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>erymanthius</i>	♀	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2431	AU04	Hap212	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>erymanthius</i>	♂	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2434	AU05	Hap213	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>erymanthius</i>	♀	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2441	AU06	Hap210	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>erymanthius</i>	♀	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2428	AU495	Hap210	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>erymanthius</i>	♂	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2433	AU496	Hap212	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>erymanthius</i>	♂	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2430	AU497	Hap216	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>erymanthius</i>	♂	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2429	AU498	Hap214	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>erymanthius</i>	♂	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2446	AU499	Hap215	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>erymanthius</i>	♀	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2440	AU500	Hap212	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>erymanthius</i>	♀	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2442	AU501	Hap214	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>erymanthius</i>	♀	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2443	AU502	Hap214	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>erymanthius</i>	♀	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2449	AU07	Hap217	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>luteomaculatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro7	Орјен / Orjen
G2450	AU08	Hap218	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>luteomaculatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro7	Орјен / Orjen
R99	AU804	Hap220	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>luteomaculatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
R50	AU805	Hap221	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>luteomaculatus</i>	♀	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
S9	AU806	Hap222	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>luteomaculatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
R74	AU807	Hap223	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>luteomaculatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
R65	AU808	Hap224	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>luteomaculatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
R71	AU809	Hap223	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>luteomaculatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
R80	AU810	Hap220	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>luteomaculatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
S10	AU811	Hap218	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>luteomaculatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
R85	AU812	Hap218	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>luteomaculatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
S2	AU813	Hap218	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>luteomaculatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

P92	P92	Hap218	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>luteomaculatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro8	Орјен / Orjen
R11	R11	Hap219	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>luteomaculatus</i>	♀	Црна Гора / Montenegro5	Орјен / Orjen
08638	AU402	Hap245	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>naxius</i>	♂	Грчка / Greece30	Наксос / Naxos
08642	AU403	Hap246	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>naxius</i>	♂	Грчка / Greece30	Наксос / Naxos
AC52	AU29	Hap234	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>naxius</i>	♀	Грчка / Greece31	Наксос / Naxos
08582	AU386	Hap242	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	♂	Грчка / Greece32	Лаконија / Laconia
08583	AU387	Hap242	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	♂	Грчка / Greece32	Лаконија / Laconia
08588	AU388	Hap243	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	♂	Грчка / Greece32	Лаконија / Laconia
08592	AU389	Hap242	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	♂	Грчка / Greece32	Лаконија / Laconia
08600	AU390	Hap242	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	♂	Грчка / Greece32	Лаконија / Laconia
08584	AU391	Hap242	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	♂	Грчка / Greece32	Лаконија / Laconia
08585	AU392	Hap242	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	♂	Грчка / Greece32	Лаконија / Laconia
08589	AU393	Hap242	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	♂	Грчка / Greece32	Лаконија / Laconia
08577	AU394	Hap244	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	♂	Грчка / Greece32	Лаконија / Laconia
08598	AU395	Hap242	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	♀	Грчка / Greece32	Лаконија / Laconia
08607	AU396	Hap242	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	♀	Грчка / Greece33	Пл. Маинало / Mtn. Mainalo
08609	AU397	Hap242	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	♀	Грчка / Greece33	Пл. Маинало / Mtn. Mainalo
08613	AU398	Hap242	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	♂	Грчка / Greece34	Лаконија / Laconia
08617	AU399	Hap242	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	♂	Грчка / Greece34	Лаконија / Laconia
08614	AU400	Hap242	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	♀	Грчка / Greece34	Лаконија / Laconia
08616	AU401	Hap242	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	♀	Грчка / Greece34	Лаконија / Laconia
10743	AU1435	Hap204	<i>bessarabicus</i>		<i>quercetorum</i>	♀	Шпанија / Spain5	Сјера Невада / Siera Nevada
10744	AU1436	Hap205	<i>bessarabicus</i>		<i>quercetorum</i>	♀	Шпанија / Spain5	Сјера Невада / Siera Nevada
10745	AU1437	Hap206	<i>bessarabicus</i>		<i>quercetorum</i>	♀	Шпанија / Spain5	Сјера Невада / Siera Nevada
10746	AU1438	Hap205	<i>bessarabicus</i>		<i>quercetorum</i>	♀	Шпанија / Spain5	Сјера Невада / Siera Nevada
10747	AU1439	Hap205	<i>bessarabicus</i>		<i>quercetorum</i>	♀	Шпанија / Spain5	Сјера Невада / Siera Nevada
10748	AU1440	Hap207	<i>bessarabicus</i>		<i>quercetorum</i>	♀	Шпанија / Spain5	Сјера Невада / Siera Nevada
/	X19	Hap203	<i>bessarabicus</i>		<i>quercetorum</i>		Шпанија / Spain6	Сјера Невада / Siera Nevada
/	X20	Hap203	<i>bessarabicus</i>		<i>quercetorum</i>		Шпанија / Spain6	Сјера Невада / Siera Nevada
/	X21	Hap203	<i>bessarabicus</i>		<i>quercetorum</i>		Шпанија / Spain6	Сјера Невада / Siera Nevada
10749	AU1441	Hap208	<i>bessarabicus</i>		<i>legionensis</i>	♀	Шпанија / Spain7	Гразалема / Grazalema
10750	AU1442	Hap209	<i>bessarabicus</i>		<i>legionensis</i>	♂	Шпанија / Spain8	Линарес де ла Сјера / Linares de la Sierra
AH42	AU152	Hap99	<i>cinereus</i>		<i>aerarius</i>	♀	Италија / Italy4	Болоња / Bologna
AH43	AU153	Hap99	<i>cinereus</i>		<i>aerarius</i>	♂	Италија / Italy4	Болоња / Bologna

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

AH44	AU154	Hap99	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Италија / Italy4	Болоња / Bologna
AH41	AU155	Hap100	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Италија / Italy4	Болоња / Bologna
AH46	AU156	Hap99	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Италија / Italy13	Болоња / Bologna
AG76	AU157	Hap101	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Србија / Serbia15	Стара Пл. / Stara Mtn.
AG51	AU158	Hap102	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Србија / Serbia6	Стара Пл. / Stara Mtn.
AG46	AU161	Hap101	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Србија / Serbia6	Стара Пл. / Stara Mtn.
R95	AU245	Hap103	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
S1	AU246	Hap103	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
S17	AU247	Hap103	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
S26	AU195	Hap103	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
S32	AU197	Hap103	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
R78	AU198	Hap103	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
R83	AU199	Hap103	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
R84	AU200	Hap104	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
R86	AU201	Hap103	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
G2325	AU202	Hap105	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Црна Гора / Montenegro7	Орјен / Orjen
G2324	AU203	Hap106	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Црна Гора / Montenegro7	Орјен / Orjen
S35	AU205	Hap103	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Црна Гора / Montenegro9	Бока Которска / Boka Kotorska
A43	AU206	Hap107	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Црна Гора / Montenegro9	Бока Которска / Boka Kotorska
A44	AU207	Hap108	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Црна Гора / Montenegro9	Бока Которска / Boka Kotorska
AH34	AU209	Hap99	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Италија / Italy4	Болоња / Bologna
AH65	AU210	Hap109	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Италија / Italy5	Пиза / Pisa
AH68	AU211	Hap109	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Италија / Italy5	Пиза / Pisa
AG19	AU212	Hap101	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Србија / Serbia7	Стара Пл. / Stara Mtn.
AG20	AU213	Hap101	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Србија / Serbia7	Стара Пл. / Stara Mtn.
AG45	AU214	Hap101	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Србија / Serbia6	Стара Пл. / Stara Mtn.
P14	AU219	Hap110	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Хрватска / Croatia1	Велебит / Velebit
P26	AU220	Hap110	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Хрватска / Croatia1	Велебит / Velebit
P27	AU221	Hap110	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Хрватска / Croatia1	Велебит / Velebit
P67	AU222	Hap110	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Хрватска / Croatia1	Велебит / Velebit
P83	AU223	Hap111	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Црна Гора / Montenegro8	Орјен / Orjen
P91	AU224	Hap112	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Црна Гора / Montenegro8	Орјен / Orjen
P94	AU225	Hap113	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Црна Гора / Montenegro8	Орјен / Orjen
P82	AU226	Hap110	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Хрватска / Croatia1	Велебит / Velebit

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

R30	AU230	Нар112	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
R39	AU231	Нар103	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Црна Гора / Montenegro1	Орјен / Orjen
R98	AU861	Нар114	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен (Orijen)
S3	AU862	Нар103	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен (Orijen)
R96	AU863	Нар104	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен (Orijen)
R89	AU864	Нар103	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен (Orijen)
S14	AU865	Нар103	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Црна Гора / Montenegro1	Орјен (Orijen)
AE56	AU874	Нар115	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Србија / Serbia7	Стара Пл. / Stara Mtn.
АН30	AU880	Нар99	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Италија / Italy14	Болоња / Bologna
АН31	AU881	Нар99	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Италија / Italy14	Болоња / Bologna
12503	AU1341	Нар116	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Србија / Serbia8	Голија / Golija
12619	AU1343	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Француска / France1	Корзика / Corsica
12621	AU1345	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Француска / France2	Корзика / Corsica
12589	AU1346	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Француска / France3	Корзика / Corsica
12590	AU1347	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Француска / France3	Корзика / Corsica
12591	AU1348	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Француска / France3	Корзика / Corsica
12622	AU1349	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Француска / France4	Корзика / Corsica
12567	AU1350	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Француска / France5	Корзика / Corsica
12568	AU1351	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Француска / France5	Корзика / Corsica
12544	AU1352	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Француска / France6	Корзика / Corsica
12545	AU1353	Нар118	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Француска / France6	Корзика / Corsica
12546	AU1354	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Француска / France6	Корзика / Corsica
12547	AU1355	Нар119	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Француска / France6	Корзика / Corsica
12548	AU1356	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Француска / France6	Корзика / Corsica
12549	AU1357	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Француска / France6	Корзика / Corsica
12550	AU1358	Нар120	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Француска / France6	Корзика / Corsica
12551	AU1359	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Француска / France6	Корзика / Corsica
12783	AU1375	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Италија / Italy6	Сардинија / Sardinia
12785	AU1377	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Италија / Italy6	Сардинија / Sardinia
12786	AU1378	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Италија / Italy6	Сардинија / Sardinia
12787	AU1379	Нар121	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Италија / Italy6	Сардинија / Sardinia
12789	AU1380	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♀	Италија / Italy7	Сардинија / Sardinia
12821	AU1383	Нар122	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Италија / Italy8	Сардинија / Sardinia
12822	AU1384	Нар117	<i>cinereus</i>	<i>aerarius</i>	♂	Италија / Italy8	Сардинија / Sardinia

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

12823	AU1385	Нар123	<i>cinereus</i>		<i>aerarius</i>	♀	Италија / Italy8	Сардинија / Sardinia
12824	AU1386	Нар117	<i>cinereus</i>		<i>aerarius</i>	♂	Италија / Italy8	Сардинија / Sardinia
12876	AU1387	Нар117	<i>cinereus</i>		<i>aerarius</i>	♂	Италија / Italy9	Сардинија / Sardinia
12877	AU1388	Нар123	<i>cinereus</i>		<i>aerarius</i>	♂	Италија / Italy11	Сардинија / Sardinia
12831	AU1389	Нар117	<i>cinereus</i>		<i>aerarius</i>	♀	Италија / Italy10	Сардинија / Sardinia
12825	AU1390	Нар117	<i>cinereus</i>		<i>aerarius</i>	♂	Италија / Italy10	Сардинија / Sardinia
12843	AU1391	Нар117	<i>cinereus</i>		<i>aerarius</i>	♀	Италија / Italy10	Сардинија / Sardinia
M78	AU142	Нар62	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro10	Дурмитор / Durmitor
M76	AU144	Нар62	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro10	Дурмитор / Durmitor
M67	AU145	Нар98	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro11	Дурмитор / Durmitor
M70	AU146	Нар97	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro11	Дурмитор / Durmitor
M73	AU147	Нар62	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro10	Дурмитор / Durmitor
M55	AU540	Нар93	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro11	Дурмитор / Durmitor
M60	AU542	Нар92	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro11	Дурмитор / Durmitor
M64	AU543	Нар62	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♀	Црна Гора / Montenegro11	Дурмитор / Durmitor
07748	AU544	Нар91	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♂	Грчка / Greece35	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
07747	AU545	Нар91	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♀	Грчка / Greece35	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
07746	AU546	Нар91	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♀	Грчка / Greece35	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
07745	AU547	Нар91	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♀	Грчка / Greece35	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
07765	AU550	Нар91	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♀	Грчка / Greece35	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
06109	AU552	Нар91	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♀	Грчка / Greece36	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
06106	AU553	Нар90	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♂	Грчка / Greece37	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
G0238	AU241	Нар62	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♀	Црна Гора / Montenegro12	Проклетије / Prokletije
M71	GUN26	Нар62	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro11	Дурмитор / Durmitor
M79	GUN27	Нар62	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro10	Дурмитор / Durmitor
M75	GUN28	Нар62	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♂	Црна Гора / Montenegro10	Дурмитор / Durmitor
M50	M50	Нар89	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♀	Црна Гора / Montenegro11	Дурмитор / Durmitor
M51	M51	Нар62	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	♀	Црна Гора / Montenegro11	Дурмитор / Durmitor
M1	AU149	Нар95	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>balkanicus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
L99	AU150	Нар96	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>balkanicus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
M8	AU151	Нар95	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>balkanicus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
L95	GUN21	Нар96	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>balkanicus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
L98	GUN22	Нар96	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>balkanicus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
M5	GUN23	Нар95	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>balkanicus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

M6	GUN24	Hap95	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>balkanicus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
M7	GUN25	Hap96	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>balkanicus</i>	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
N14	N14	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N2	N2	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N27	N27	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N53	N53	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N65	N65	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N68	N68	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N72	N72	Hap88	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♀	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N8	N8	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N62	AU507	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N19	AU509	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♀	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N21	AU510	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♀	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N28	AU511	Hap94	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♀	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N77	AU512	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♀	Аустрија / Austria2	Алпи / Alps
N64	AU513	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♀	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N60	AU514	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♀	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N38	AU515	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♀	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N40	AU516	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♀	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N43	AU517	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♀	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N15	GUN37	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♀	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N18	GUN39	Hap87	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
G1083	AU102	Hap51		<i>caerulescens</i>	<i>caerulescens</i>	♂	Грчка / Greece38	Родос / Rhodes
G1110	AU103	Hap52		<i>caerulescens</i>	<i>caerulescens</i>	♀	Грчка / Greece39	Родос / Rhodes
G1108	AU104	Hap53		<i>caerulescens</i>	<i>caerulescens</i>	♀	Грчка / Greece39	Родос / Rhodes
G1109	AU105	Hap52		<i>caerulescens</i>	<i>caerulescens</i>	♂	Грчка / Greece39	Родос / Rhodes
T56	AU106	Hap51		<i>caerulescens</i>	<i>caerulescens</i>	♂	Грчка / Greece40	Родос / Rhodes
T62	AU107	Hap51		<i>caerulescens</i>	<i>caerulescens</i>	♀	Грчка / Greece41	Родос / Rhodes
T63	AU108	Hap53		<i>caerulescens</i>	<i>caerulescens</i>	♀	Грчка / Greece41	Родос / Rhodes
06375	AU175	Hap54		<i>caerulescens</i>	<i>atricapillatus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece42	Крит / Crete
06376	AU176	Hap55		<i>caerulescens</i>	<i>atricapillatus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece42	Крит / Crete
06379	AU177	Hap56		<i>caerulescens</i>	<i>atricapillatus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece42	Крит / Crete
06380	AU178	Hap56		<i>caerulescens</i>	<i>atricapillatus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece42	Крит / Crete
06383	AU179	Hap57		<i>caerulescens</i>	<i>atricapillatus</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece42	Крит / Crete

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

06382	AU181	Hap56		<i>caerulescens</i>	<i>atricapillatus</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece42	Крит / Crete
/	AU884	Hap58	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>carpathicus</i> sp. n.	♂	Румунија / Romania1	Буковина / Bukovina
13487	AU1443	Hap58	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>carpathicus</i> sp. n.	♀	Румунија / Romania1	Буковина / Bukovina
12351	AU1331	Hap77	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>iliricus</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia9	Златар / Zlatar
12352	AU1332	Hap78	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>iliricus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia9	Златар / Zlatar
12353	AU1333	Hap79	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>iliricus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia9	Златар / Zlatar
12387	AU1334	Hap80	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>iliricus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia10	Златар / Zlatar
12408	AU1361	Hap77	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>iliricus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia11	Голија / Golija
12354	AU1362	Hap77	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>iliricus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia9	Златар / Zlatar
12355	AU1363	Hap77	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>iliricus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia9	Златар / Zlatar
12388	AU1364	Hap82	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>iliricus</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia10	Златар / Zlatar
12389	AU1360	Hap72	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia10	Златар / Zlatar
12409	AU1337	Hap81	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia11	Голија / Golija
12489	AU1338	Hap72	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia8	Голија / Golija
12492	AU1339	Hap72	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia8	Голија / Golija
12498	AU1340	Hap72	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia8	Голија / Golija
L93	AU237	Hap63	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
L94	AU238	Hap64	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
M9	AU239	Hap64	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
M11	AU240	Hap63	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia2	Стара Пл. / Stara Mtn.
G1831	AU529	Hap72	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia12	Копаоник / Kopaonik
G1873	AU530	Hap73	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia13	Копаоник / Kopaonik
G1855	AU531	Hap72	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia13	Копаоник / Kopaonik
G1822	AU532	Hap72	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia12	Копаоник / Kopaonik
G0241	AU533	Hap72	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia12	Копаоник / Kopaonik
AE32	AU534	Hap72	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia13a	Копаоник / Kopaonik
AE31	AU535	Hap72	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia13a	Копаоник / Kopaonik
N85	AU536	Hap72	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia14	Копаоник / Kopaonik
N86	AU537	Hap72	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia14	Копаоник / Kopaonik
N87	AU538	Hap74	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♂	Србија / Serbia14	Копаоник / Kopaonik
AG71	AU557	Hap64	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia15	Стара Пл. / Stara Mtn.
AG68	AU558	Hap64	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	♀	Србија / Serbia15	Стара Пл. / Stara Mtn.
M21	AU1365	Hap83	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>aff. cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria3	Алпи / Alps
M22	AU1366	Hap84	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>aff. cinereus</i>	♀	Аустрија / Austria3	Алпи / Alps

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

M28	AU1369	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria3	Алпи / Alps
M33	AU1370	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria3	Алпи / Alps
M34	AU1371	Hap84	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>aff. cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria3	Алпи / Alps
M35	AU1372	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria3	Алпи / Alps
M36	AU1373	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria3	Алпи / Alps
N33	AU215	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
M20	AU216	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria4	Алпи / Alps
M30	AU360	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria3	Алпи / Alps
M31	AU361	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria3	Алпи / Alps
M32	AU362	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria3	Алпи / Alps
N4	AU508	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♀	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N24	AU887	Hap68	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>aff. cinereus</i>	♀	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
M27	AU522	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N50	AU523	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N49	AU524	Hap69	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N48	AU525	Hap70	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N47	AU526	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N73	AU1395	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♀	Аустрија / Austria4	Алпи / Alps
N76	AU1396	Hap85	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♀	Аустрија / Austria2	Алпи / Alps
M37	AU1397	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria2	Алпи / Alps
N29	AU1404	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N34	AU1405	Hap86	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N37	AU1406	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N35	AU1408	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N47	AU1409	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N58	AU1410	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N66	AU1411	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
N70	AU1413	Hap59	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	♂	Аустрија / Austria1	Алпи / Alps
O18	AU218	Hap60	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Хрватска / Croatia2	Велебит / Velebit
O45	AU227	Hap60	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♂	Хрватска / Croatia2	Велебит / Velebit
O54	AU228	Hap61	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♂	Хрватска / Croatia1	Велебит / Velebit
O59	AU229	Hap60	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♂	Хрватска / Croatia1	Велебит / Velebit
P52	AU232	Hap60	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Хрватска / Croatia1	Велебит / Velebit
P24	AU233	Hap60	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Хрватска / Croatia1	Велебит / Velebit

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

O89	AU234	Hap60	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Хрватска / Croatia1	Велебит / Velebit
O69	AU236	Hap62	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♂	Хрватска / Croatia1	Велебит / Velebit
N79	AU242	Hap62	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Црна Гора / Montenegro12	Проклетије / Prokletije
N80	GUN36	Hap62	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Црна Гора / Montenegro12	Проклетије / Prokletije
N81	AU244	Hap62	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Црна Гора / Montenegro12	Проклетије / Prokletije
AB96	AU248	Hap65	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Македонија / Macedonia	Кожуф / Kožuf
AC3	AU249	Hap66	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Македонија / Macedonia	Кожуф / Kožuf
AB99	AU250	Hap67	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Македонија / Macedonia	Кожуф / Kožuf
AB98	AU251	Hap62	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Македонија / Macedonia	Кожуф / Kožuf
AB97	AU252	Hap62	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Македонија / Macedonia	Кожуф / Kožuf
G0954	AU527	Hap71	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♂	Бугарска / Bulgaria2	Родопи / Rodopi Mtn.
AB92	AU554	Hap62	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Македонија / Macedonia	Кожуф / Kožuf
AB93	AU555	Hap75	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Македонија / Macedonia	Кожуф / Kožuf
AB89	GUN29	Hap62	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Македонија / Macedonia	Кожуф / Kožuf
AB94	GUN30	Hap62	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Македонија / Macedonia	Кожуф / Kožuf
AC2	GUN31	Hap62	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Македонија / Macedonia	Кожуф / Kožuf
AC1	GUN32	Hap62	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Македонија / Macedonia	Кожуф / Kožuf
AC4	GUN33	Hap62	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Македонија / Macedonia	Кожуф / Kožuf
AB91	GUN34	Hap62	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Македонија / Macedonia	Кожуф / Kožuf
AB95	GUN35	Hap62	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	♀	Македонија / Macedonia	Кожуф / Kožuf
Đ96	AU116	Hap124	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Мароко / Morocco2	Средње Атласке пл.
Đ31	AU117	Hap125	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♀	Мароко / Morocco2	Средње Атласке пл.
Đ32	AU118	Hap126	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Мароко / Morocco2	Средње Атласке пл.
Đ39	AU119	Hap127	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♀	Мароко / Morocco2	Средње Атласке пл.
Đ40	AU120	Hap128	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♀	Мароко / Morocco2	Средње Атласке пл.
Đ45	AU121	Hap129	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♀	Мароко / Morocco3	близу Оузана / near Ouzane
Đ51	AU122	Hap130	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Мароко / Morocco4	Тетуан-Тангер / Tetouan-Tanger
Đ54	AU123	Hap131	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Мароко / Morocco4	Тетуан-Тангер / Tetouan-Tanger
09370	AU752	Hap148	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♀	Шпанија / Spain9	Алгецирас / Algeciras
09371	AU753	Hap149	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♀	Шпанија / Spain9	Алгецирас / Algeciras
09373	AU754	Hap149	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Шпанија / Spain9	Алгецирас / Algeciras
09374	AU755	Hap150	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Шпанија / Spain9	Алгецирас / Algeciras
09376	AU756	Hap148	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Шпанија / Spain9	Алгецирас / Algeciras
08914	AU757	Hap151	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Шпанија / Spain10	Ел Портил / El Portil

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

08915	AU758	Нар152	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Шпанија / Spain10	Ел Портил / El Portil
08916	AU759	Нар151	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Шпанија / Spain10	Ел Портил / El Portil
08917	AU760	Нар153	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Шпанија / Spain10	Ел Портил / El Portil
08920	AU761	Нар154	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Шпанија / Spain10	Ел Портил / El Portil
09474	AU762	Нар155	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Шпанија / Spain11	Гразалема / Grazalema
09475	AU763	Нар156	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Шпанија / Spain11	Гразалема / Grazalema
09479	AU764	Нар156	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♀	Шпанија / Spain11	Гразалема / Grazalema
09457	AU765	Нар149	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♀	Шпанија / Spain12	Гразалема / Grazalema
09459	AU766	Нар149	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♀	Шпанија / Spain12	Гразалема / Grazalema
09431	AU767	Нар149	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♀	Шпанија / Spain4	Болоња / Bologna
09464	AU768	Нар157	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Шпанија / Spain4	Болоња / Bologna
09440	AU769	Нар148	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Шпанија / Spain4	Болоња / Bologna
09441	AU770	Нар149	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♀	Шпанија / Spain4	Болоња / Bologna
09442	AU771	Нар157	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	♂	Шпанија / Spain4	Болоња / Bologna
AL37	AU124	Нар132	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♂	Грчка / Greece43	Тасос / Thasos
AL36	AU125	Нар132	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♂	Грчка / Greece46	Тасос / Thasos
AL34	AU126	Нар133	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♂	Грчка / Greece46	Тасос / Thasos
AL40	AU127	Нар132	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♂	Грчка / Greece43	Тасос / Thasos
AL38	AU128	Нар132	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♂	Грчка / Greece43	Тасос / Thasos
AL39	AU129	Нар132	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♂	Грчка / Greece43	Тасос / Thasos
AL42	AU130	Нар132	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♀	Грчка / Greece43	Тасос / Thasos
G2517	AU131	Нар134	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♀	Грчка / Greece13	Атики / Atiki
06446	AU182	Нар135	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♂	Грчка / Greece44	Ханија / Chania
06482	AU183	Нар136	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♂	Грчка / Greece45	Ахаја / Achaea
06465	AU184	Нар137	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♂	Грчка / Greece45	Ахаја / Achaea
06466	AU185	Нар138	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♂	Грчка / Greece45	Ахаја / Achaea
06469	AU186	Нар139	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♂	Грчка / Greece45	Ахаја / Achaea
06471	AU187	Нар136	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♂	Грчка / Greece45	Ахаја / Achaea
06484	AU188	Нар138	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♂	Грчка / Greece45	Ахаја / Achaea
07006	AU311	Нар140	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♀	Грчка / Greece55	Анафи / Anafi
07005	AU312	Нар138	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♀	Грчка / Greece56	Иос / Ios
07004	AU313	Нар141	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♀	Грчка / Greece56	Иос / Ios
07003	AU314	Нар142	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	♂	Грчка / Greece56	Иос / Ios
09305	AU640	Нар143	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>paulum</i> sp. n.	♂	Италија / Italy3	Сицилија / Sicily

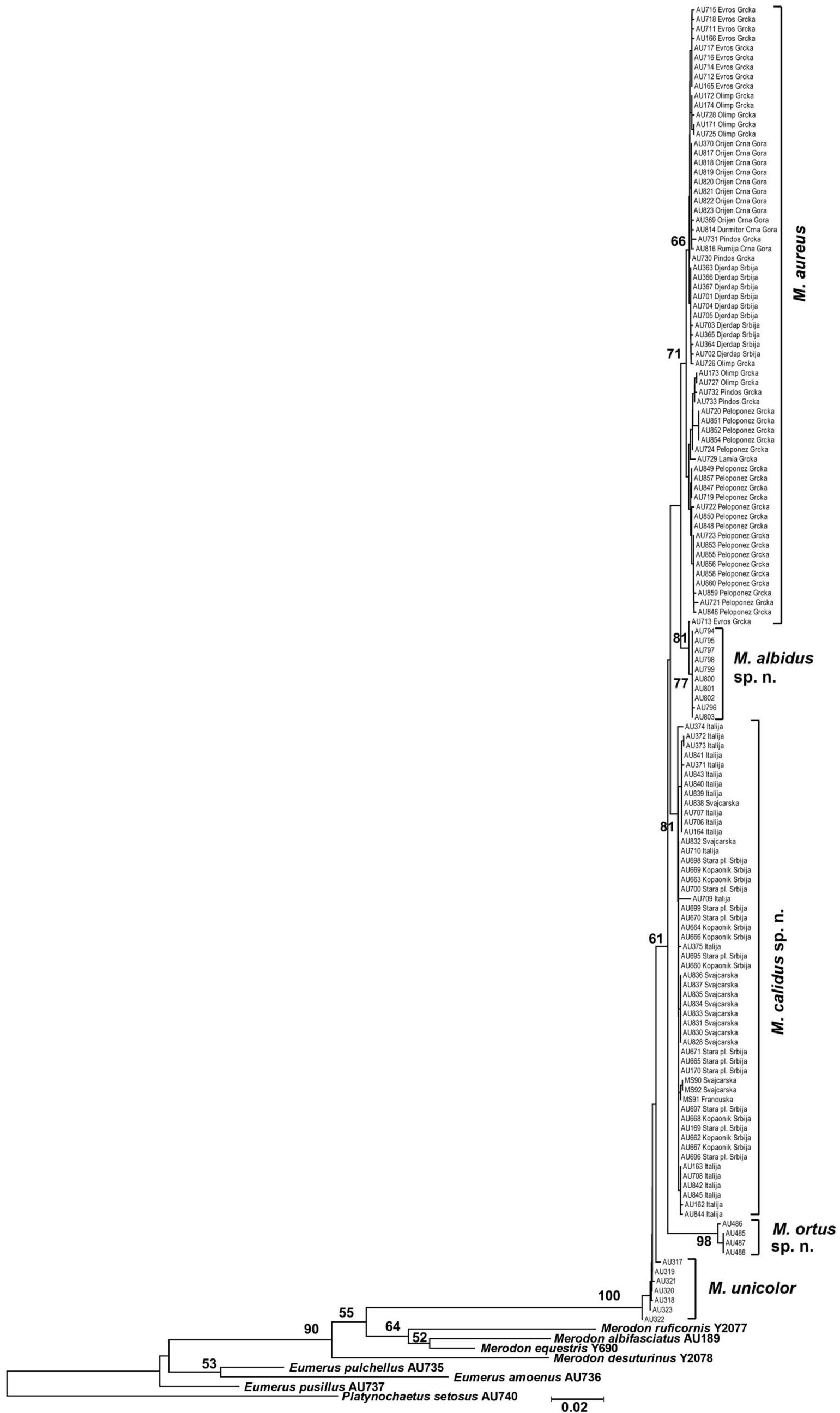
Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

09306	AU641	Нар144	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>paulum</i> sp. n.	♂	Италија / Italy3	Сицилија / Sicily
09307	AU642	Нар145	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>paulum</i> sp. n.	♂	Италија / Italy3	Сицилија / Sicily
09308	AU643	Нар146	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>paulum</i> sp. n.	♂	Италија / Italy3	Сицилија / Sicily
09309	AU644	Нар147	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>paulum</i> sp. n.	♂	Италија / Italy3	Сицилија / Sicily
F28	AU109	Нар303	<i>chalybeus</i>		<i>robustus</i>	♂	Грчка / Greece57	Самос / Samos
F40	AU110	Нар303	<i>chalybeus</i>		<i>robustus</i>	♀	Грчка / Greece58	Самос / Samos
F46	AU111	Нар303	<i>chalybeus</i>		<i>robustus</i>	♂	Грчка / Greece58	Самос / Samos
F49	AU112	Нар303	<i>chalybeus</i>		<i>robustus</i>	♂	Грчка / Greece58	Самос / Samos
F50	AU113	Нар303	<i>chalybeus</i>		<i>robustus</i>	♂	Грчка / Greece58	Самос / Samos
F60	AU114	Нар303	<i>chalybeus</i>		<i>robustus</i>	♂	Грчка / Greece58	Самос / Samos
F62	AU115	Нар303	<i>chalybeus</i>		<i>robustus</i>	♂	Грчка / Greece58	Самос / Samos
AL49	AU35	Нар254	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Грчка / Greece59	Еврос / Evros
T15	AU36	Нар254	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Грчка / Greece60	Еврос / Evros
T14	AU37	Нар254	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Грчка / Greece60	Еврос / Evros
T3	AU38	Нар254	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Грчка / Greece60	Еврос / Evros
T2	AU39	Нар254	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Грчка / Greece60	Еврос / Evros
T1	AU40	Нар254	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Грчка / Greece60	Еврос / Evros
T16	AU41	Нар254	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Грчка / Greece60	Еврос / Evros
08493	AU415	Нар256	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Румунија / Romania2	Мангалиа / Mangalia
08495	AU417	Нар257	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Румунија / Romania2	Мангалиа / Mangalia
08496	AU418	Нар258	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Румунија / Romania3	Мангалиа / Mangalia
08513	AU419	Нар259	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Румунија / Romania3	Мангалиа / Mangalia
08500	AU423	Нар258	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Румунија / Romania4	Мангалиа / Mangalia
08512	AU632	Нар256	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Румунија / Romania4	Мангалиа / Mangalia
08511	AU633	Нар266	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Румунија / Romania4	Мангалиа / Mangalia
08510	AU634	Нар267	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Румунија / Romania4	Мангалиа / Mangalia
08509	AU635	Нар256	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Румунија / Romania4	Мангалиа / Mangalia
08508	AU636	Нар267	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Румунија / Romania4	Мангалиа / Mangalia
08507	AU637	Нар256	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Румунија / Romania4	Мангалиа / Mangalia
08506	AU638	Нар256	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Румунија / Romania4	Мангалиа / Mangalia
08505	AU639	Нар258	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	♂	Румунија / Romania4	Мангалиа / Mangalia
AJ8	AU32	Нар251	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>puniceus</i>	♂	Турска / Turkey11	Пл. Боздаг / Mtn. Bozdag
AL29	AU33	Нар252	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>puniceus</i>	♂	Турска / Turkey17	Пл. Боздаг / Mtn. Bozdag
AJ13	AU34	Нар253	<i>dobrognensis</i>	<i>dobrognensis</i>	<i>puniceus</i>	♂	Турска / Turkey11	Пл. Боздаг / Mtn. Bozdag

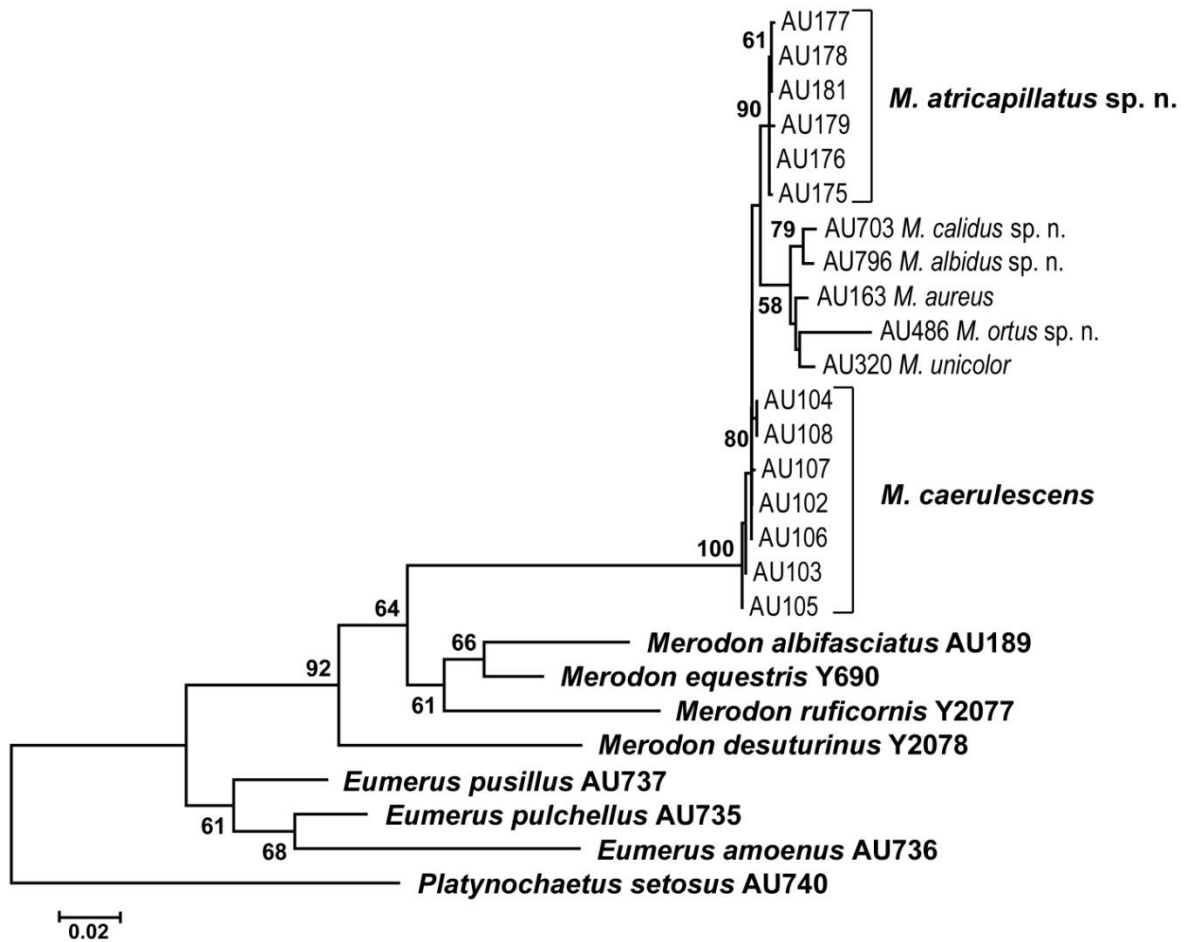
Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

08668	AU410	Hap255	<i>dobrogensis</i>	<i>dobrogensis</i>	<i>puniceus</i>	♂	Турска / Turkey18	Пл. Боздаг / Mtn. Bozdag
08675	AU411	Hap255	<i>dobrogensis</i>	<i>dobrogensis</i>	<i>puniceus</i>	♂	Турска / Turkey12	Пл. Боздаг / Mtn. Bozdag
08677	AU412	Hap255	<i>dobrogensis</i>	<i>dobrogensis</i>	<i>puniceus</i>	♂	Турска / Turkey12	Пл. Боздаг / Mtn. Bozdag
08682	AU413	Hap251	<i>dobrogensis</i>	<i>dobrogensis</i>	<i>puniceus</i>	♂	Турска / Turkey12	Пл. Боздаг / Mtn. Bozdag
G2392	AU42	Hap260	<i>dobrogensis</i>		<i>rojoi</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
AL12	AU43	Hap261	<i>dobrogensis</i>		<i>rojoi</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece9	Пл. Пиндос / Mtn. Pindos
G2377	AU44	Hap262	<i>dobrogensis</i>		<i>rojoi</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece61	Пл. Олимп / Mtn. Olympus
G2378	AU45	Hap262	<i>dobrogensis</i>		<i>rojoi</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2379	AU46	Hap263	<i>dobrogensis</i>		<i>rojoi</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2380	AU47	Hap264	<i>dobrogensis</i>		<i>rojoi</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2381	AU48	Hap263	<i>dobrogensis</i>		<i>rojoi</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2382	AU49	Hap265	<i>dobrogensis</i>		<i>rojoi</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2385	AU50	Hap263	<i>dobrogensis</i>		<i>rojoi</i> sp. n.	♀	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos
G2384	AU51	Hap263	<i>dobrogensis</i>		<i>rojoi</i> sp. n.	♂	Грчка / Greece29	Пл. Еримантос / Mtn. Erimanthos

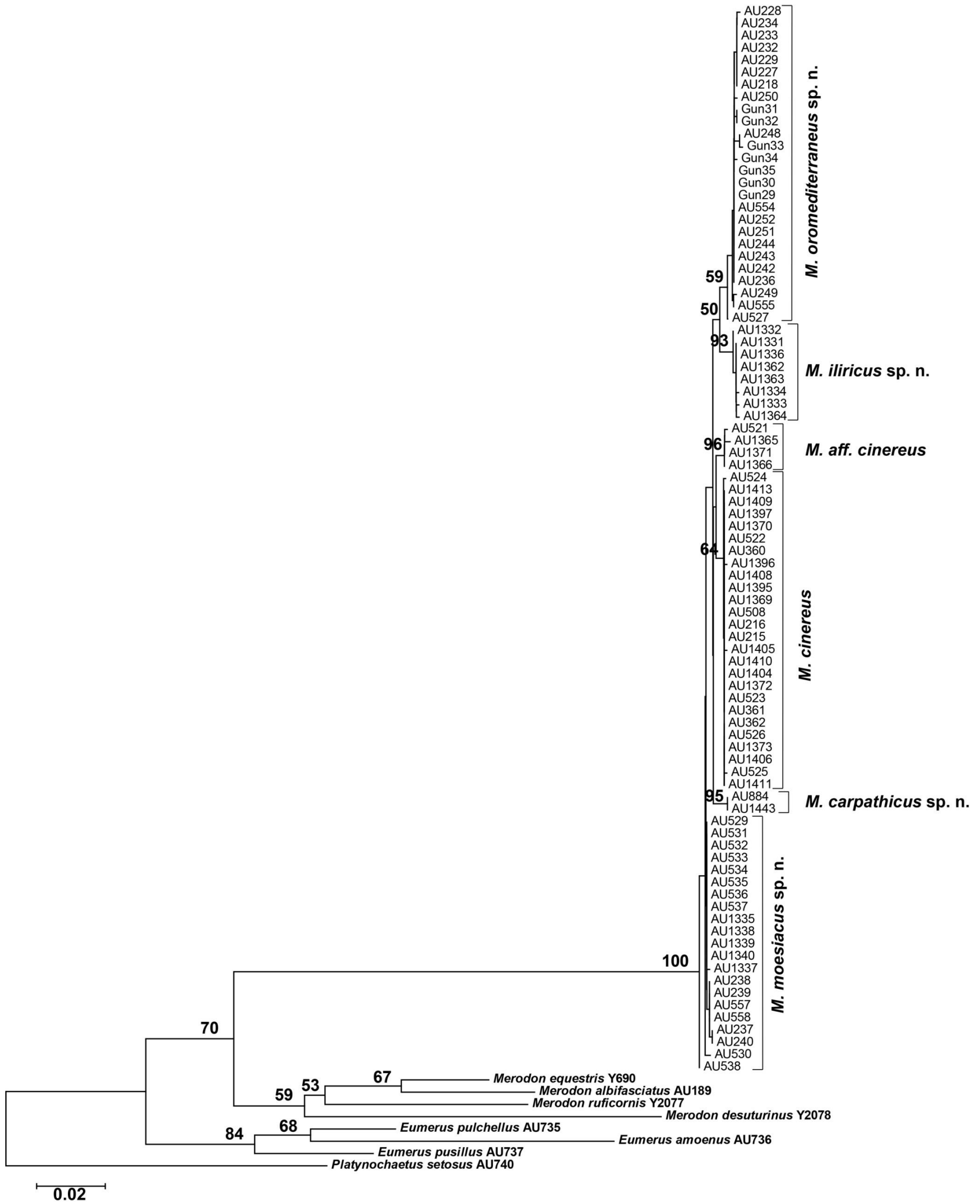
10.2. Прилог 2



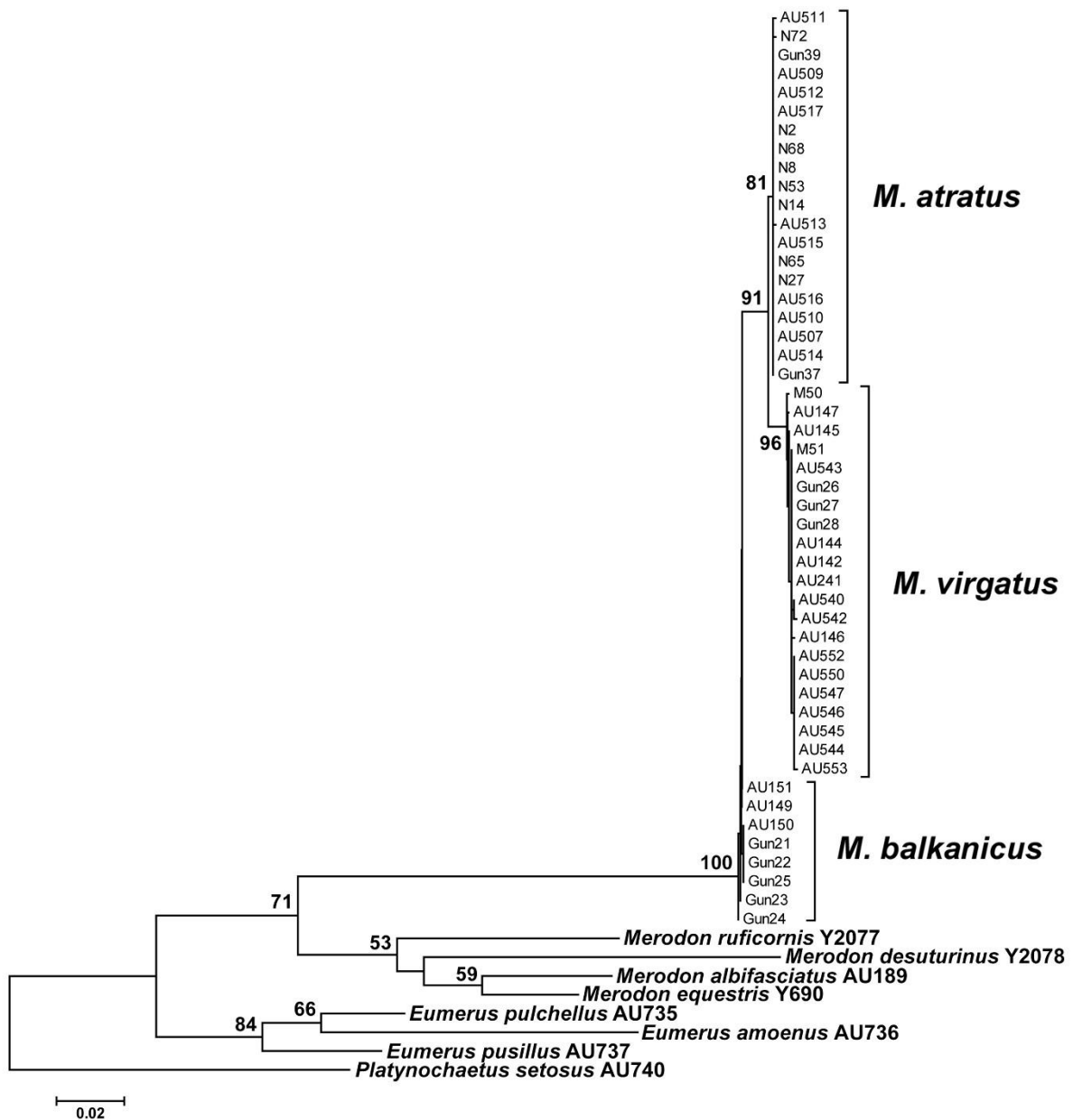
Слика П1. Neighbor-joining COI стабло *Merodon aureus* подгрупе. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне класе приказане су поред чворова. /
 Figure P1. Neighbor-joining COI tree of *Merodon aureus* subgroup. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.



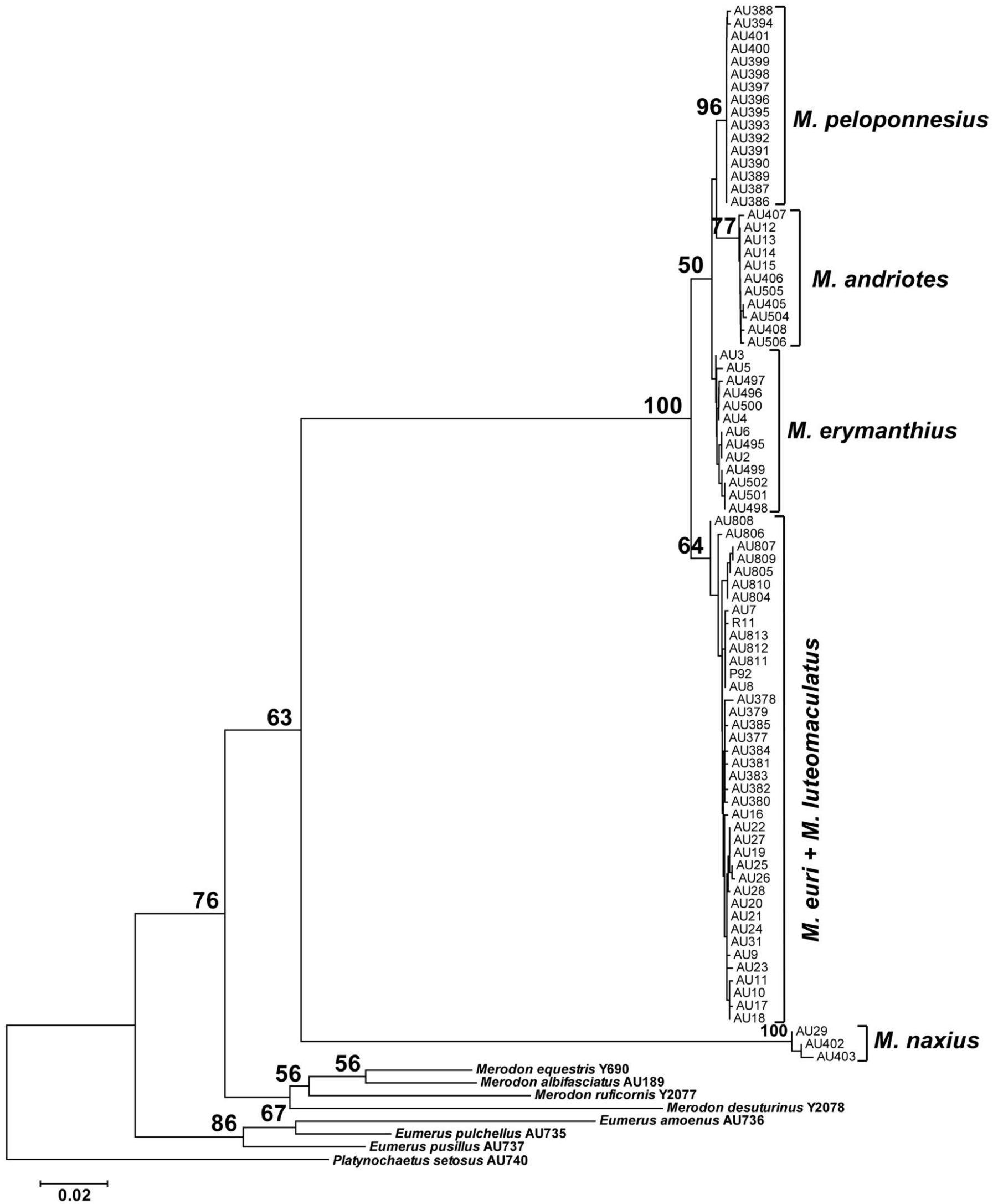
Слика П2. Neighbor-joining COI стабло *Merodon caerulescens* комплекса. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / Figure P2. Neighbor-joining COI tree of *Merodon caerulescens* complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.



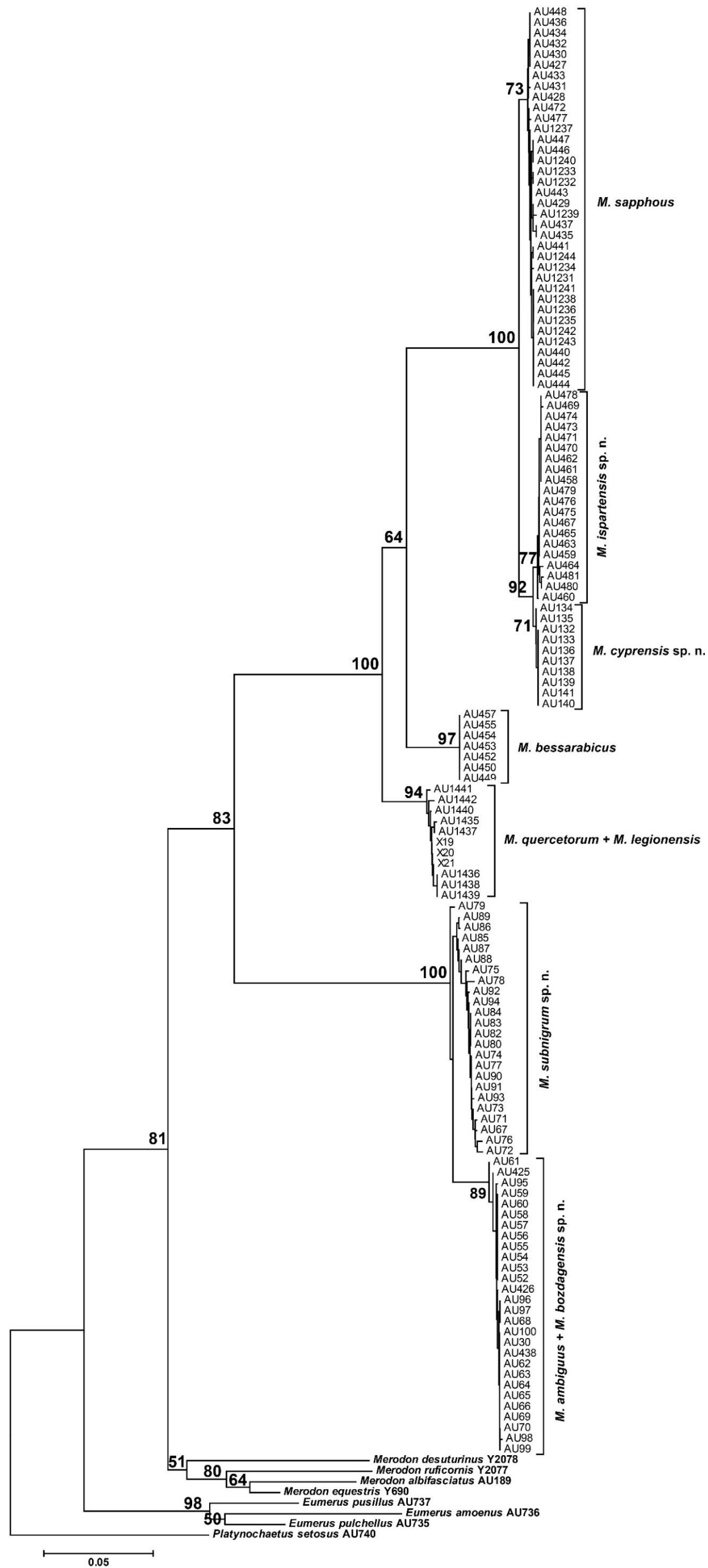
Слика П3. Neighbor-joining COI стабло *Merodon cinereus* комплекса. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне класе приказане су поред чворова. / Figure P3. Neighbor-joining COI tree of *Merodon cinereus* complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.



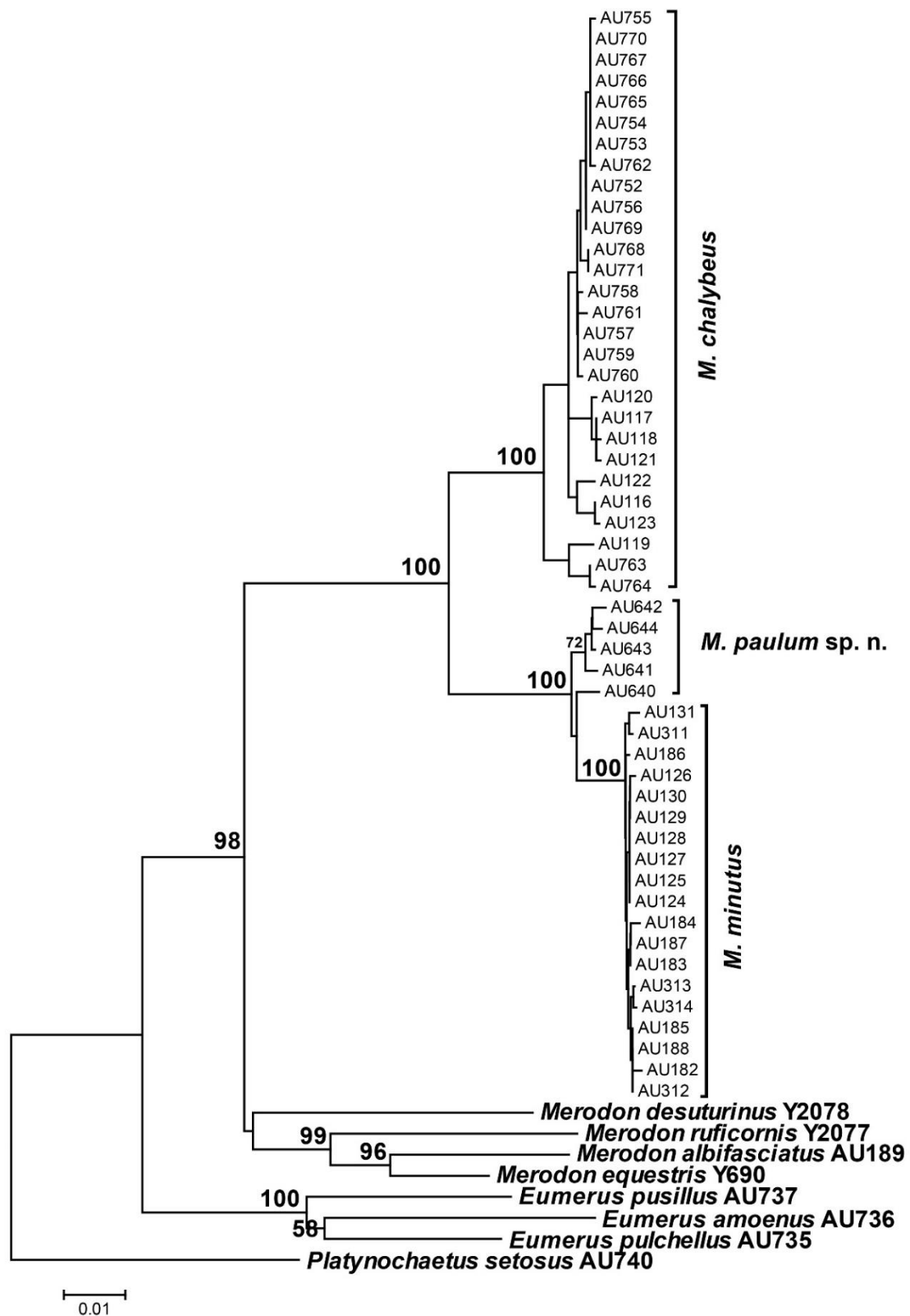
Слика П4. Neighbor-joining COI стабло *Merodon atratus* комплекса. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / Figure P4. Neighbor-joining COI tree of *Merodon atratus* complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.



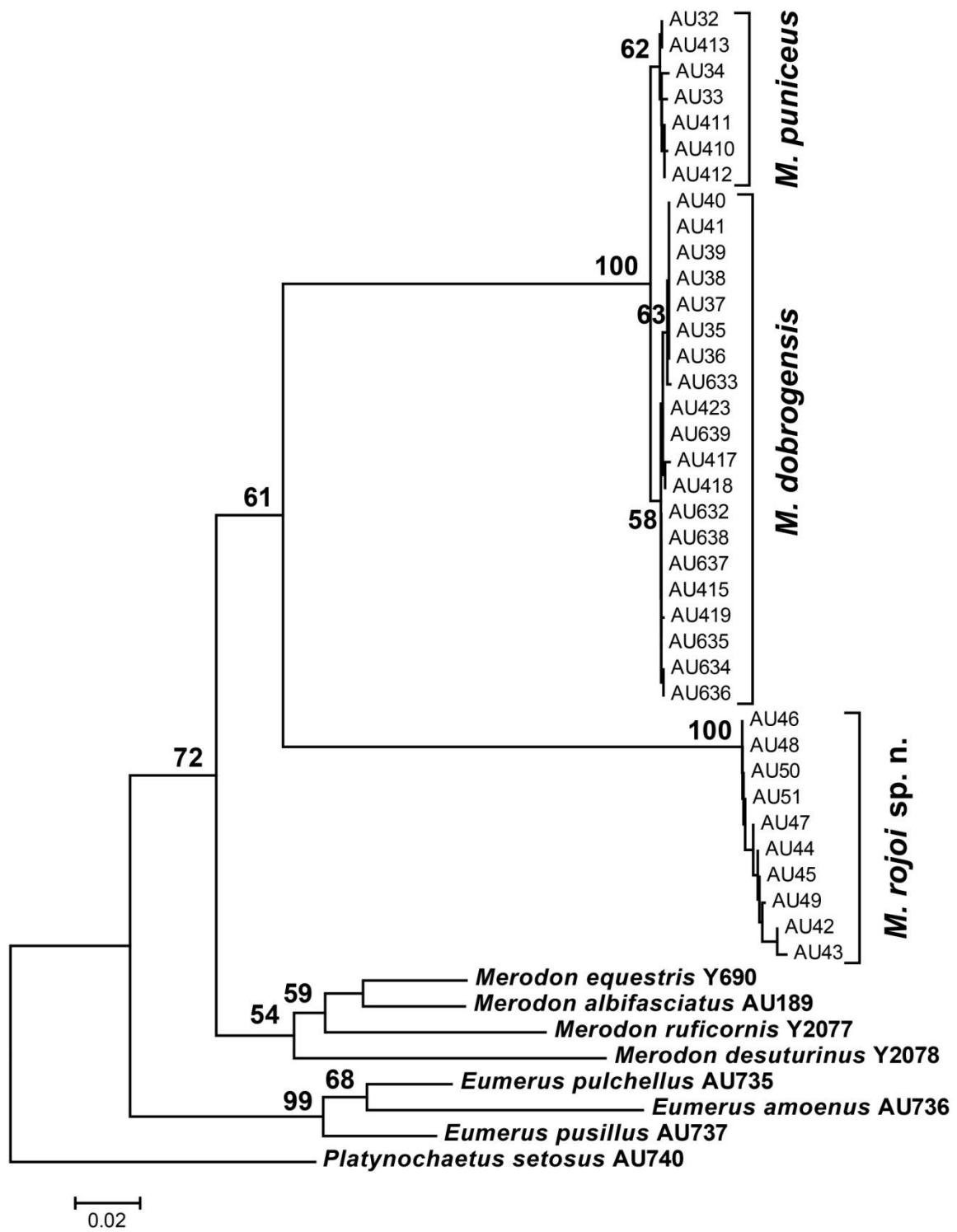
Слика П5. Neighbor-joining COI стабло *Merodon luteomaculatus* комплекса. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / Figure P5. Neighbor-joining COI tree of *Merodon luteomaculatus* complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.



Слика П6. Neighbor-joining COI стабло за *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* и *M. ambiguaus* комплексе. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / Figure P6. Neighbor-joining COI tree of *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* and *M. ambiguaus* complexes. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near node.

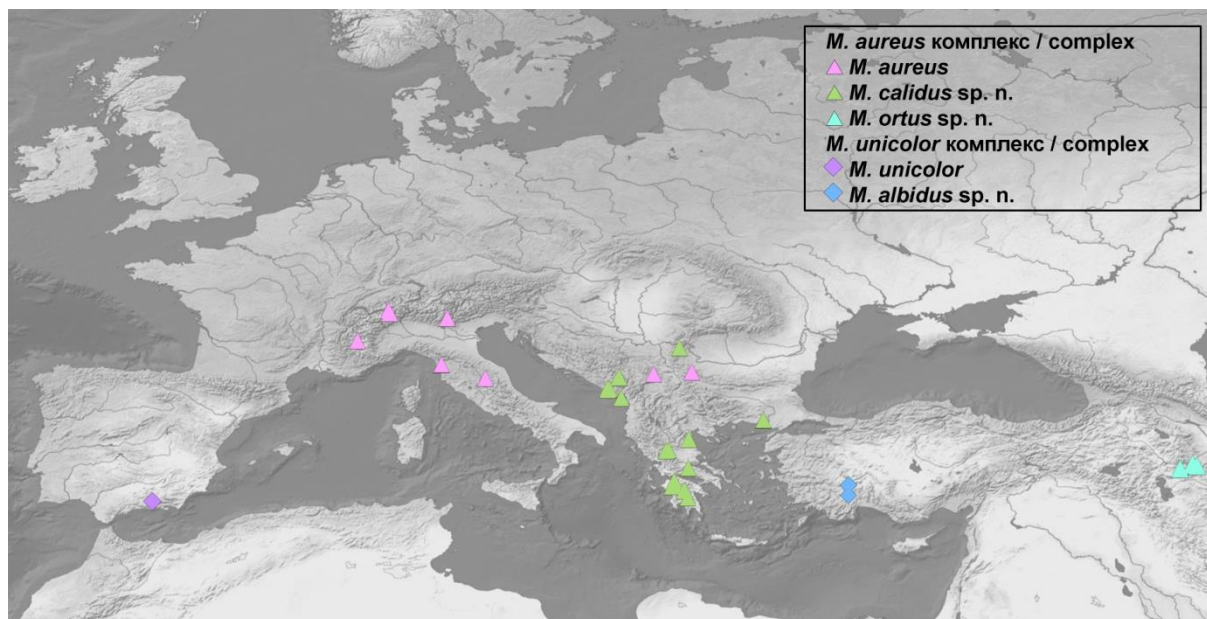


Слика П7. Neighbor-joining COI стабло *Merodon chalybeus* комплекса. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне кладе приказане су поред чворова. / Figure P7. Neighbor-joining COI tree of *Merodon chalybeus* complex. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.

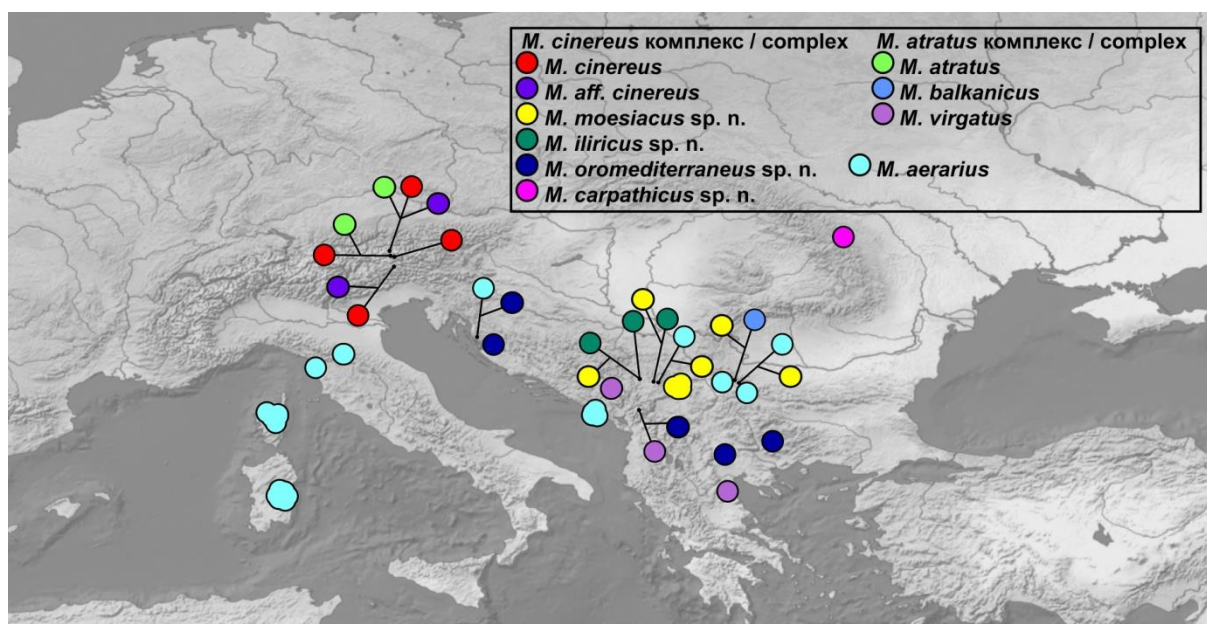


Слика П8. Neighbor-joining COI стабло *Merodon dobrogensis* подгрупе. Bootstrap вредности ≥ 50 за главне класе приказане су поред чворова. / Figure P8. Neighbor-joining COI tree of *Merodon dobrogensis* subgroup. The bootstrap values ≥ 50 for main clades are indicated near nodes.

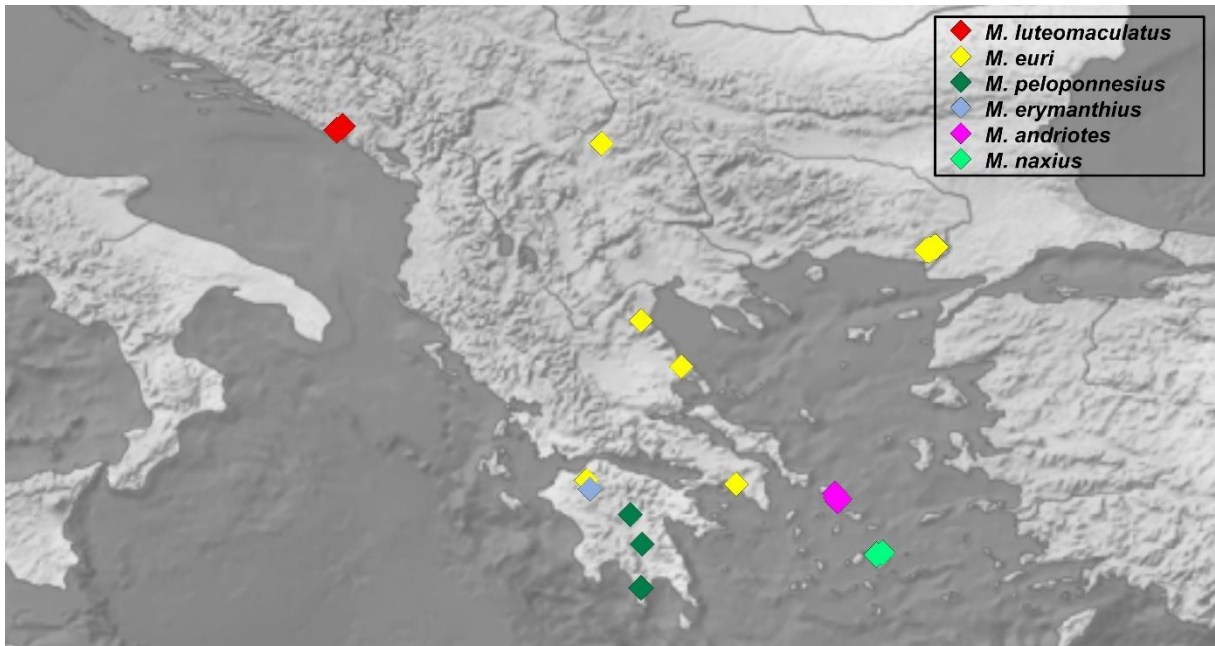
10.3. Прилог 3



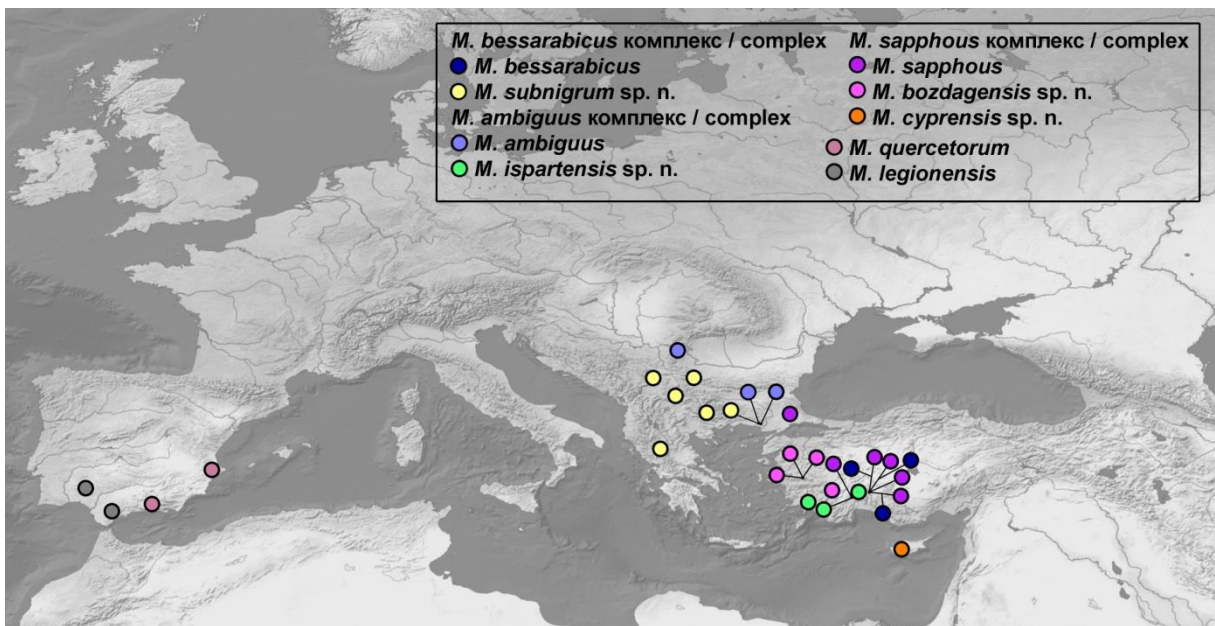
Слика П1. Мапа дистрибуције узорака *Merodon aureus* подгрупе. / Figure P1. Distribution map of *Merodon aureus* subgroup samples.



Слика П2. Мапа дистрибуције узорака *Merodon cinereus* подгрупе. / Figure P2. Distribution map of *Merodon cinereus* subgroup samples.



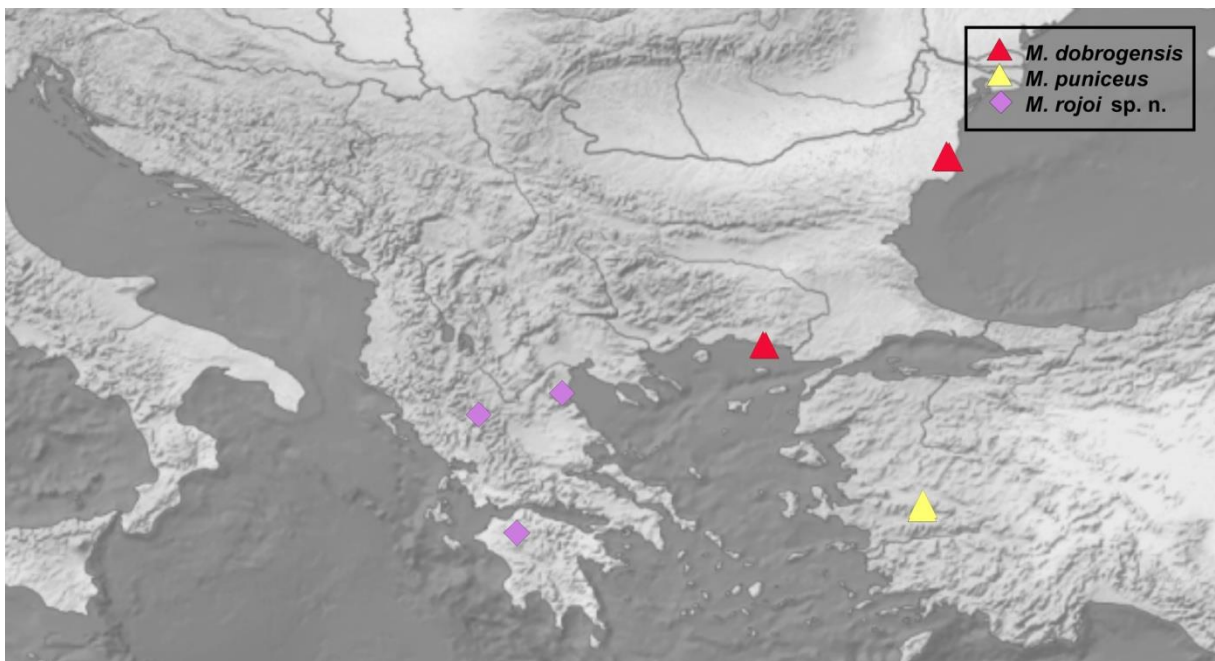
Слика П3. Мапа дистрибуције узорака *Merodon luteomaculatus* комплекса. / *Figure P3. Distribution map of Merodon luteomaculatus complex samples.*



Слика П4. Мапа дистрибуције узорака *Merodon bessarabicus* комплекса, *M. sapphous* комплекса и *M. ambiguus* комплекса. / *Figure P4. Distribution map of Merodon bessarabicus complex, M. sapphous complex u M. ambiguus complex samples.*



Слика П5. Мапа дистрибуције узорака *Merodon chalybeus* комплекса. / *Figure P5. Distribution map of Merodon chalybeus complex samples.*



Слика П6. Мапа дистрибуције узорака *Merodon dobrogensis* подгрупе. / *Figure P6. Distribution map of Merodon dobrogensis subgroup samples.*

10.4. Прилог 4

Табела П1. Дистрибуција COI хаплотипова, врста, комплекса и подгрупа *Merodon aureus* групе по државама узорковања. / Table P1. The distribution of COI haplotypes, species, complexes and subgroups of *Merodon aureus* group accros the sampling countries.

Држава / Country	Подгрупа / Subgroup	Комплекс / Complex	Врста / Species	Број хаплотипова / Haplotype number	Укупан број хаплотипова* / Total number of haplotypes*
Аустрија / Austria	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>atratus</i>	3	11
	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	8	
Бугарска / Bulgaria	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	1	2
	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	1	
Грчка / Greece	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	23	111
	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	2	
		<i>caerulescens</i>	<i>caerulescens</i>	3	
		<i>caerulescens</i>	<i>atricapillatus</i> sp. n.	4	
	<i>bessarabicus</i>		<i>nisi</i>	19	
	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>huri</i>	14	
	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>erymanthius</i>	7	
	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>peloponnesius</i>	3	
	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>androites</i>	5	
	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>naxius</i>	3	
	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	2	
	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	7	
	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>minutus</i>	11	
	<i>chalybeus</i>		<i>robustus</i>	1	
	<i>dobrogensis</i>	<i>dobrogensis</i>	<i>dobrogensis</i>	1	
<i>dobrogensis</i>		<i>rojoi</i> sp. n.	6		

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

Иран / <i>Iran</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>ortus</i> sp. n.	1	1
Италија / <i>Italy</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	8	20
	<i>cinereus</i>		<i>aerarius</i>	7	
	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>paulum</i> sp. n.	5	
Кипар / <i>Cyprus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>cyprensis</i> sp. n.	1	1
Македонија / <i>Macedonia</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	6	6
Мароко / <i>Morocco</i>			<i>pumilus</i>	2	10
	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	8	
Румунија / <i>Romania</i>	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>carpathicus</i> sp. n.	1	7
	<i>dobrogensis</i>	<i>dobrogensis</i>	<i>dobrogensis</i>	6	
Србија / <i>Serbia</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	1	35
	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	3	
	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>iliricus</i> sp. n.	5	
	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>moesiacus</i> sp. n.	6	
	<i>cinereus</i>		<i>aerarius</i>	4	
	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>balkanicus</i>	2	
	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>euri</i>	4	
	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ambiguus</i>	2	
	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>subnigrum</i> sp. n.	8	

Табела П1 (наставак) / Table P1 (continuing)

Турска / Turkey	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>albidus</i> sp. n.	2	32
	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	<i>bessarabicus</i>	1	
	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>sapphous</i>	14	
	<i>bessarabicus</i>	<i>sapphous</i>	<i>bozdagensis</i> sp. n.	5	
	<i>bessarabicus</i>	<i>ambiguus</i>	<i>ispartensis</i> sp. n. sp. n.	6	
	<i>dobrogensis</i>	<i>dobrogensis</i>	<i>puniceus</i>	4	
Француска / France	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	1	5
	<i>cinereus</i>		<i>aerarius</i>	4	
Хрватска / Croatia	<i>cinereus</i>		<i>aerarius</i>	1	4
	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	3	
Црна Гора / Montenegro	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>calidus</i> sp. n.	4	28
	<i>cinereus</i>	<i>cinereus</i>	<i>oromediterraneus</i> sp. n.	1	
	<i>cinereus</i>	<i>atratus</i>	<i>virgatus</i>	6	
	<i>cinereus</i>		<i>aerarius</i>	10	
	<i>bessarabicus</i>	<i>luteomaculatus</i>	<i>luteomaculatus</i>	8	
Швајцарска / Switzerland	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	<i>aureus</i>	3	3
Шпанија / Spain	<i>aureus</i>	<i>unicolor</i>	<i>unicolor</i>	5	36
	<i>bessarabicus</i>		<i>quercetorum</i>	5	
	<i>bessarabicus</i>		<i>legionensis</i>	2	
	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	<i>chalybeus</i>	10	
			<i>pumilus</i>	10	
			<i>unguicornis</i>	4	

*Поновљени хаплотипови заједнички за више врста су урачунати само једном. / *Repeted haplotypes shared among species were counted only one time.

Табела П2. Преглед генотипова 28S рДНК за *Merodon aureus* групу. / Table P2. List of 28S genotypes of *Merodon aureus* group.

Генотип / <i>Genotyp</i>	Врста / <i>Species</i>	ДНК код / <i>DNA ID</i>					
I	<i>M. aureus</i>	AU695	AU696	AU697	AU699		
	<i>M. calidus</i> sp. n.	AU701	AU702	AU703	AU704	AU705	AU713
		AU714	AU715	AU716	AU717	AU718	AU721
		AU723	AU724	AU725	AU726	AU727	AU729
		AU730	AU733	AU165	AU166	AU171	AU172
		AU173	AU174	AU364	AU365	AU366	AU367
		AU369	AU370	AU712	AU719	AU720	AU722
		AU728	AU731	AU732	AU814	AU816	AU817
		AU818	AU821	AU846	AU847	AU848	AU851
		AU852	AU853	AU855	AU856	AU857	AU858
AU859	AU860						
II	<i>M. calidus</i> sp. n.	AU363					
III	<i>M. calidus</i> sp. n.	AU849	AU850				
IV	<i>M. aureus</i>	AU169					
V	<i>M. ortus</i> sp. n.	AU485	AU486	AU488			
VI	<i>M. aureus</i>	AU164	AU373	AU375	AU660	AU662	AU663
		AU664	AU665	AU666	AU668	AU669	AU670
		AU671	AU698	AU828	AU830	AU831	AU832
		AU835	AU836	AU837			
VII	<i>M. aureus</i>	AU700	AU706	AU707	AU708	AU162	AU163
		AU170	AU371	AU372	AU374	AU376	AU709
		AU833	AU834	AU838	AU839	AU840	AU841
		AU842	AU843	AU844	AU845		

Табела П2 (наставак) / Table P2 (continuing)

VIII	<i>M. aureus</i>	AU710					
IX	<i>M. unicolor</i>	AU318	AU319	AU320	AU321	AU322	AU323
	<i>M. albidus</i> sp. n.	AU794	AU795	AU796	AU797	AU798	AU799
X	<i>M. caerulescens</i>	AU800	AU801	AU802	AU803		
XI	<i>M. caerulescens</i>	AU102	AU103	AU105	AU106	AU108	
	<i>M. atricapillatus</i> sp. n.	AU104	AU107				
XII	<i>M. pumilus</i>	AU175	AU176	AU177	AU178	AU179	AU181
		AU253	AU254	AU742	AU743	AU745	AU746
XIII	<i>M. robustus</i>	AU747	AU748	AU749	AU750	AU751	
		AU109	AU110	AU111	AU112	AU113	AU114
XIV	<i>M. chalybeus</i>	AU115					
		AU756	AU757	AU758	AU760	AU761	AU762
		AU763	AU768	AU769	AU770	AU771	AU116
		AU117	AU118	AU119	AU120	AU121	AU122
XV	<i>M. chalybeus</i>	AU123					
		AU752	AU753	AU754	AU755	AU764	AU765
XVI	<i>M. chalybeus</i>	AU766	AU767				
XVII	<i>M. paulum</i> sp. n.	AU759					
XVIII	<i>M. paulum</i> sp. n.	AU640	AU642	AU644			
XIX	<i>M. minutus</i>	AU641	AU643				
XX	<i>M. unguicornis</i>	AU130	AU131	AU311	AU312	AU313	
		AU324	AU326	AU327			

Табела П2 (наставак) / Table P2 (continuing)

XXI	<i>M. atratus</i>	N68	N53	N14			
	<i>M. virgatus</i>	AU553 AU544	AU552	AU550	AU547	AU546	AU545
	<i>M. balkanicus</i>	AU151 Gun21	AU150	Gun25	Gun24	Gun23	Gun22
	<i>M. aerarius</i>	AU152	AU153	AU154	AU155	AU156	AU157
		AU158	AU161	AU195	AU197	AU198	AU199
		AU200	AU201	AU202	AU203	AU205	AU206
		AU207	AU209	AU210	AU211	AU212	AU213
		AU214	AU219	AU220	AU221	AU222	AU223
		AU224	AU225	AU226	AU230	AU231	AU245
		AU246	AU247	AU861	AU862	AU863	AU864
		AU865	AU874	AU880	AU881	AU1341	AU1343
AU1345		AU1346	AU1347	AU1348	AU1349	AU1350	
AU1351		AU1352	AU1354	AU1355	AU1356	AU1357	
AU1358	AU1359	AU1375	AU1377	AU1378	AU1379		
AU1380	AU1384	AU1385	AU1386	AU1387	AU1388		
AU1389	AU1390	AU1391					
<i>M. bessarabicus</i>	AU449 AU457	AU450	AU452	AU453	AU454	AU455	
<i>M. erymanthius</i>	AU2 AU500	AU3 AU499	AU4 AU498	AU5 AU497	AU6 AU496	AU502 AU495	
<i>M. nisi</i>	AU101 AU1421	AU1414 AU1422	AU1417 AU1424	AU1418 AU1427	AU1419 AU1432	AU1420 AU1433	

Табела П2 (наставак) / Table P2 (continuing)

XXII	<i>M. atratus</i>	N72	N65	N27	N8	N2	Gun39
	<i>M. ispartensis</i> sp. n.	AU458	AU459	AU460	AU461	AU462	AU463
		AU464	AU465	AU467	AU469	AU470	AU471
		AU472	AU473	AU474	AU475	AU476	AU477
AU478		AU479	AU480	AU481			
<i>M. ambiguus</i>	AU30	AU52	AU53	AU54	AU55	AU56	
	AU57	AU58	AU59	AU60	AU61	AU62	
	AU63	AU64	AU65	AU66	AU68	AU69	
	AU70						
XXIII	<i>M. atratus</i>	AU517	AU516	AU515	AU514	AU513	AU512
		AU511	AU509	AU507	Gun37		
	<i>M. virgatus</i>	AU543	AU542	AU540	M50	Gun28	Gun27
		Gun26	AU147	AU146	AU145	AU144	AU142
		AU241					
	<i>M. subnigrum</i> sp. n.	AU67	AU71	AU72	AU73	AU74	AU75
AU76		AU77	AU78	AU79	AU80	AU82	
AU83		AU84	AU85	AU86	AU87	AU88	
AU89		AU90	AU91	AU92	AU93	AU94	
XXIV	<i>M. luteomaculatus</i>	AU7	AU8	P92	R11	AU804	AU805
		AU806	AU807	AU808	AU809	AU810	AU811
		AU812	AU813				
XXV	<i>M. euri</i>	AU10	AU11	AU16	AU17	AU18	AU19
		AU20	AU21	AU22	AU23	AU24	AU25
		AU26	AU27	AU28	AU31	AU377	AU378
		AU379	AU380	AU381	AU382	AU383	AU384

Табела П2 (наставак) / Table P2 (continuing)

XXV	<i>M. euri</i>	AU385					
	<i>M. naxius</i>	AU29	AU402	AU403			
	<i>M. peloponnesius</i>	AU386	AU387	AU388	AU389	AU390	AU391
		AU392	AU393	AU394	AU395	AU396	AU397
<i>M. andriotes</i>	AU398	AU399	AU400	AU401			
	AU405	AU406	AU407	AU408	AU506	AU505	
XXVI	<i>M. cinereus</i>	AU504	AU14	AU15			
		AU215	AU216	AU360	AU361	AU362	AU508
		AU522	AU523	AU524	AU525	AU526	AU1369
		AU1370	AU1372	AU1373	AU1395	AU1397	AU1404
		AU1405	AU1406	AU1408	AU1409	AU1410	AU1411
	<i>M. aff. cinereus</i>	AU1413					
		AU521	AU1371	AU1365	AU1366		
	<i>M. oromediterraneus</i> sp. n.	AU218	AU227	AU228	AU229	AU232	AU233
		AU234	AU236	AU242	AU243	AU248	AU249
		AU242	AU243	AU248	AU249	AU250	AU251
AU252		AU527	AU554	AU555	Gun29	Gun30	
Gun31		Gun32	Gun33	Gun34	Gun35		
<i>M. iliricus</i> sp. n.	AU1331	AU1332	AU1333	AU1334	AU1336	AU1362	
	AU1363	AU1364					
<i>M. moesiacus</i> sp. n.	AU237	AU238	AU239	AU240	AU529	AU530	
	AU531	AU532	AU533	AU534	AU535	AU536	
	AU537	AU538	AU557	AU558	AU1335	AU1337	
	AU1338	AU1339	AU1340				
XXVII	<i>M. carpathicus</i> sp. n.	AU1443	AU884				

Табела П2 (наставак) / Table P2 (continuing)

XXVIII	<i>M. legionensis</i>	AU1441	AU1442				
XXIX	<i>M. quercetorum</i>	AU1436	AU1437	AU1438	AU1439	AU1440	X20
XXX	<i>M. quercetorum</i>	AU1435					
XXXI	<i>M. cyprensis</i> sp. n.	AU136	AU138	AU139			
	<i>M. bozdagensis</i> sp. n.	AU425 AU99	AU426 AU100	AU95	AU96	AU97	AU98
XXXII	<i>M. sapphous</i>	AU1231	AU1232	AU1233	AU1234	AU1235	AU1236
		AU1237	AU1238	AU1239	AU1240	AU1241	AU1242
		AU1243	AU1244	AU427	AU428	AU429	AU430
AU431		AU432	AU433	AU434	AU435	AU436	
AU437		AU440	AU441	AU442	AU443	AU444	
		AU445	AU446	AU447	AU448		
	<i>M. cyprensis</i> sp. n.	AU132 AU141	AU133	AU134	AU135	AU137	AU140
	<i>M. bozdagensis</i> sp. n.	AU438					
XXXIII	<i>M. puniceus</i>	AU32 AU413	AU33	AU34	AU410	AU411	AU412
	<i>M. dobrogensis</i>	AU35 AU41 AU633 AU639	AU36 AU417	AU37 AU418	AU38 AU419	AU39 AU423	AU40 AU632 AU638
XXXIV	<i>M. rojoi</i> sp. n.	AU42 AU49	AU44 AU50	AU45 AU51	AU46	AU47	AU48

10.5. Прилог 5

Табела П1. Листа 16S секвенци *Wolbachia* А и В супергрупа присутних у инсекатским домаћинима. / *Table P1. The list of Wolbachia 16S sequences representing A and B bacterial supergroups present in insect hosts.*

Врста домаћин / <i>Host species</i>	Ред / <i>Order</i>	16S приступни број (Банка Гена) / <i>accession number (GenBank)</i>	Супергрупа / <i>Supergroup</i>
<i>Nasonia giraulti</i> Darling, 1990	Hymenoptera	M84690	
<i>Nasonia vitripennis</i> (Walker, 1836)	Hymenoptera	M84688	
<i>Nasonia longicornis</i> Darling, 1990	Hymenoptera	M84691	
<i>Drosophila sechellia</i> Tsacas and Baechli, 1981	Diptera	U17059	A
<i>Drosophila melanogaster</i> Meigen, 1830	Diptera	PK*	
<i>Diabrotica virgifera</i> LeConte, 1868	Coleoptera	U83098	
<i>Muscidifurax uniraptor</i> Kogan and Legner, 1970	Hymenoptera	L02882	
<i>Nasonia vitripennis</i> (Walker, 1836)	Hymenoptera	M84686	
<i>Nasonia longicornis</i> Darling, 1990	Hymenoptera	M84692	
<i>Encarsia formosa</i> Gahan, 1924	Hymenoptera	AF045189	
<i>Trichogramma pretiosum</i> Riley, 1879	Hymenoptera	L02885	B
<i>Culex pipiens</i> Linnaeus, 1758	Diptera	X61768	
<i>Callosobruchus chinensis</i> Linnaeus, 1758	Diptera	AB025965	
<i>Gryllus pennsylvanicus</i> Burmeister, 1838	Orthoptera	U83090	

*ДНК код секвенце која није депонована у Банку Гена. / *DNA ID of sequence which is not uploaded in GenBank.*

Припадност супергрупи преузета је из Vandekerckhove и сар. (1999) and Augustinos и сар. (2011). / *The supergroup designation is according to Vandekerckhove et al. (1999) and Augustinos et al. (2011).*

11. Extended abstract

During the first few years of the twenty-first century, with the aim of discovering and describing the existing diversity in taxonomy, the analysis of DNA sequence variability of selected genetic markers are being introduced and the importance of integrating knowledge from different disciplines is emphasized (Goulding and Dayrat, 2016). Combining data with the goal of discovering new species becomes the basis for a new approach in taxonomy. Integrative taxonomy involves the integration of information obtained by applying morphological studies, genetics, geometric morphometrics, distribution analysis, ecological requirements, etc. (Dayrat, 2005; Pires and Marinoni, 2010). This approach has made rapid progress in discovering new species and solving taxonomy of complex groups with closely related and cryptic species.

The aim of integrative taxonomy is to delimit units of life's diversity from multiple and complementary perspectives (phylogeography, comparative morphology, population genetics, ecology, development, behaviour, etc.) (Dayrat, 2005). Traditional taxonomy approach based on morphological character states has limitations for species identification, especially in cases of phenotypic plasticity, the presence of morphologically cryptic taxa, and as a consequence of morphological diversity in different life stages and between genders (Hebert et al., 2003a). Implementation of molecular data in taxonomy proved to be helpful for resolving species status in many cases. In the last few years, traditional taxonomy is often combined with molecular analyses of sequence data of 5' end of mitochondrial COI gene, which is the bases of DNA barcoding procedure (Hebert et al., 2003a, b). However, the use of single gene approach for species delimitation presents some important constraints, particularly if based on the mitochondrial gene (see Galtier et al., 2009; Hubert and Hanner, 2015). Thus, molecular analysis of COI gene in taxonomy, systematics and phylogeny of hoverflies is often combined with analyses of nuclear molecular markers, such as rRNA genes (18S and 28S) (e.g. Skevington and Yeates, 2000; Ståhls and Nyblom, 2000; Pérez-Bañón et al., 2003; Ståhls et al., 2003; Massetti et al., 2006; Mengual et al. al., 2008a, b; Reemer and Ståhls, 2013; Mengual et al., 2015). Within the genus *Merodon*, Mengual et al. (2006) confirmed the phylogenetic relationships between Iberian hoverfly species using the molecular analysis of the COI and 28S rRNA sequences. Combined analysis of COI and 28S confirmed similar phylogenetic relationships within the genus *Merodon* from Europe and Turkey (Vujić et al., 2012).

Assessing taxonomic relationships within the genus *Merodon* has been a challenge because of the presence of multiple cryptic taxa, and the lack of consistent and reliable diagnostic markers (Milankov et al., 2009). The taxonomic challenge posed by cryptic species has been recognized for a long time, but the advent of relatively inexpensive and rapid DNA sequencing has given biologists a new tool for detecting and differentiating morphologically similar species (Bickford et al., 2007). Because of morphological similarity, cryptic species could only be resolved using molecular data but should be validated using geographical distribution data, ecological preferences and other relevant information (Mayr, 1996).

Based on the analysis of subtle variations of morphological characters Šašić et al. (2016) proposed the introduction of four levels of the hierarchical classification of the genus *Merodon* according to morphological differentiation (Fig. 1). The first, broadest level refers to large monophyletic **clades** that include a large number of morphologically diverse groups of species. Four clades are defined: *M. aureus*, *M. albifrons*, *M. desuturinus* and *M. avidus* (*M. nigratarsis*) (sensu Mengual et al., 2006). The next, lower level includes taxa that comprise morphologically defined **groups** of species. Within *M. aureus* clade, these are *M. aureus*, *M. funestus*, *M. nanus*, *M. spinatarsis*, and *M. bombiforimis* groups (sensu Radenković et al., 2011). The third level consists of **subgroups** that include species very similar in morphology but with clear differences in the morphological character between the species of different subgroups. The lowest, fourth level of this classification are **species complexes** consisting of taxa which cannot be distinguished based on the variation of morphological characters used in the classical taxonomic approach. Species within the species complexes can be distinguished using methods of integrative taxonomy involving the analysis of molecular markers, morphometry and ecology.

The *Merodon aureus* species group comprises species morphologically closely related to *M. aureus* Fabricius, 1805. These taxa are small sized (8-13 mm), with a short, rounded abdomen, a distinct spike on the metatrochanter in males and a characteristic structure of the male genitalia (Vujić et al., 2007; Radenković et al., 2011). The group contains altogether 30 previously-known and newly-discovered taxa from the Mediterranean region and southern European mountain regions (Marcos-García et al., 2007; Vujić et al., 2007; Milankov et al., 2008a; Radenković et al., 2011; Speight, 2014; Šašić et al., 2016; Veselić et al., 2017; Radenković et al., 2018). Application of molecular data for the taxonomy of *M. aureus* species group pointed out the potential existence of additional, cryptic taxa within the group (Mengual et al., 2006; Milankov et al., 2008a). Mengual et al. (2006) showed that two

morphologically very similar specimens of *M. unicolor* had a COI divergence of 1.25% which indicated the presence of cryptic species. Additionally, six diagnosable cryptic taxa were identified within morphologically defined species *M. aureus* and *M. cinereus*, on the Balkan Peninsula (Milankov et al., 2008a). *M. cinereus* B sensu Milankov et al., 2008a were later resolved as three species complexes named *M. atratus* species complex (Šašić et al., 2016). Additionally, Radenković et al. (2018) resolved *M. luteomaculatus* complex as a complex of six species new to science.

The aims of this research are: **1.** to calculate molecular diversity parameters within and between species of *Merodon aureus* species group; **2.** to define species borders between taxa within *M. aureus* species group on the bases of sequence divergence of cytochrome c oxidase I (COI) and 28S rRNA genes; **3.** to propose phylogeographical scenario of the *M. aureus* species group and discuss taxon speciation within the group; **4.** to create the sequence database of COI and 28S rRNA genes of *M. aureus* species group.

Material and methods. The sampling of hoverflies specimens of *Merodon aureus* species group was carried out during four years period, from 2012 to 2015. The sampling area included fourteen countries in the South Europe (Spain, Switzerland, France, Austria, Italy, Croatia, Montenegro, Serbia, Bulgaria, Macedonia, Romania, Greece, Turkey, Cyprus), Iran (Asia) and Morocco (Africa) (Fig. 2). A total of 797 *M. aureus* group's specimens were collected in order to study the molecular diversity of this species group.

The genomic DNA of the hoverflies specimens was extracted using SDS (sodium dodecyl sulfate) extraction protocol described by Chen et al. (2010), with slight changes to the protocol. The commercial primers C1-J-2183 (also known as Jerry) and TL2-N-3014 (also known as Pat) were used for 3'COI amplification and sequencing (Simon et al., 1994), LCO1490 and HCO2198 (Folmer et al., 1994) were used for the 5' end of COI (barcode sequence), and F2 and 3DR (Belshaw et al., 2001) for the D2-3 region of 28S rRNA gene (Tab. 1). A non-anchored repeated tetra-nucleotide primer, (GACA)₄, was used for PCR amplification of Inter Simple Sequence Repeats (ISSR).

In order to check the presence of *Wolbachia* infection in the specimens of hoverflies, I tested genomic DNA of 1-2 specimens from each species from *Merodon aureus* group. The screening was based on detection of bacterial DNA in total genomic DNA of hoverflies through amplification of the bacterial 16S rRNA gene fragment. In addition to 16S rRNA, the samples were tested by amplification of the *Wolbachia* surface protein (*wsp*) gene.

The sequences were edited for base-calling errors and aligned manually, and the sequence matrices were prepared in BioEdit 7.0.9.0. (Hall, 1999). DNA polymorphism was estimated using DnaSP version 5 (Librado and Rozas, 2009). Arlequin 3.5.1.3. (Excoffier and Lischer, 2010) was used for analysis of molecular variance (AMOVA) and pairwise species divergence comparisons. A Median-joining network was constructed by PopART (Leigh and Bryant, 2015; <http://popart.otago.ac.nz>). Parsimony analyses were performed in NONA (Goloboff, 1999) spawned with the aid of Winclada (Nixon, 2002). The ML tree was constructed using RAxML 8.2.8 (Stamatakis, 2014) using the CIPRES Science Gateway web portal (Miller et al., 2010). Additionally, the Neighbor-joining phylogenetic trees (Saitou and Nei, 1987) were constructed using the MEGA6 software (Tamura et al., 2013). Putative species limits were explored with Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre et al., 2012).

For ISSR allele/loci scoring, only bands that could be scored consistently among individuals were used. It was assumed that each amplified band represented a distinct locus. The fragments (bands) were scored as present=1 and absent=0. This information generated a binary matrix used for analyses. The software FreeTree (Pavlicek et al., 1999) and Treeview (Page, 1996) were used to construct Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) dendrograms based on the Nei and Li (1979) coefficient of genetic distances. AMOVA analysis was conducted in Arlequin. Genetic structure within the *Merodon luteomaculatus* complex was assessed using the software STRUCTURE ver. 2.3.4. (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2007). The CLUMPAK software (Kopelman et al., 2015) was used for graphical presentation of STRUCTURE results.

16S rDNA sequences were manually aligned, while *Wolbachia* wsp sequences were aligned using the L-INS-I strategy (precise and slow for up to 200 sequences) in the MAFFT software (Katoh and Standley, 2013; available at <https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). The *Wolbachia* sequences were checked against Nucleotide collection database, the sequential database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Additionally, wsp sequences were also verified by comparing with the *Wolbachia* MLST database (Baldo et al., 2006). To define the *Wolbachia* supergroup present in the species of *Merodon aureus* group, a 16S ML tree was constructed. The tree was constructed using the RAxML 8.2.8 (Stamatakis, 2014) software via the CIPRES

Science Gateway web portal (Miller et al., 2010). Haplotypes of *wsp* genes are defined using the DnaSP 5 program (Librado and Rozas, 2009).

Results. The genomic DNA was extracted from a total of 797 adult specimens of *Merodon aureus* species group. The amplification success was high, for 3'COI and 5'COI about 99% and for 28S rRNA gene 97.6%. A total of 718 combined 3'COI and 5'COI gene sequences and 665 sequences of the 28S rRNA gene were analyzed. The number of analyzed sequences (samples) per species varied depending on species distribution, but it also often depended on the success of collection or representation of a particular species in the total sample. In most cases, species are represented with at least 5 specimens, except in the case of *M. carpathicus* sp. n. (two), *M. naxius* (three) and *M. ortus* (four).

Within the species complexes, genetic results have pointed to the possible existence of new species which has not been described yet, and are labelled with “sp. n.” next to the suggested species name. However, their taxonomic status has to be confirmed based on additional data sources (morphology, ecology, distribution, etc.) in order to be accepted and described as valid species. The term “species” in this research has the meaning of operational taxonomic units (OTUs).

The COI gene analyses for the ***Merodon aureus* subgroup** included 138 sequences. The total length of the aligned sequences is 1400 bp. The topology of phylogenetic trees (Fig. 3 and 4, Fig. P1 in Appendix 2) indicates the following relationship: (*M. ortus* sp. n.)+((*M. unicolor*)+((*M. aureus*)+((*M. albidus* sp. n.)+(*M. calidus* sp. n.)))). The exception is AU713 specimen, founded in Greece, which morphologically belongs to *M. calidus* sp. n., but it is joined to *M. albidus* sp. n. clade. All species clades are defined with bootstrap support values above 50. Uncorrected average p distances between pairs of species of *M. aureus* subgroup ranged from 1.1% between *M. aureus* and *M. calidus* sp. n. to 2.3% between *M. calidus* sp. n. and *M. ortus* sp. n. Between *M. unicolor* and *M. albidus* sp. n. p distance is 1.4%. The highest p distance value (2.5%) is between *M. ortus* sp. n. and *M. albidus* sp. n. (Tab. 4). The ABGD analysis was applied separately for *M. aureus* complex and *M. unicolor* complex. *M. aureus* complex is divided into three groups corresponding to clades on phylogenetic trees (*M. aureus*, *M. calidus* sp. n., *M. ortus* sp. n.) based on the p distances matrix for a value of 0.0028, while based on the distances matrix T92+G, for the distances values 0.0017-0.0129, it is divided into two groups (*M. aureus* and *M. calidus* sp. n. were grouped together). The same results were obtained for the K80 model, for distances values 0.0017-0.0077. The *M. unicolor*

complex is divided into two groups (*M. unicolor*, *M. albidus* sp. n.) based on all three types of genetic distances. The analyzed COI gene sequences have 96 variable positions from which 62 positions are parsimony informative. The total number of haplotypes is 56 from which 7 belong to the species from *M. unicolor* complex and 49 to the species from *M. aureus* complex (Tab. 5 and 6). The haplotype diversity (Hd) of the subgroup is 0.95769, the average number of differences (K) is 12.06887, and the nucleotide diversity (Pi) is 0.00862 (Tab. 5). The COI Median-joining network topology indicates the grouping of haplotypes into groups which correspond to clades on phylogenetic trees (Fig. 6). AMOVA analysis confirmed genetic structure which was shown in phylogenetic analyses and by the haplotype network construction ($\Phi_{ST}=0.80174$). The obtained Φ_{ST} values between species pairs were in the range from 0.65152 (*M. albidus* sp. n. and *M. calidus* sp. n.) to 0.98118 (*M. albidus* sp. n. and *M. ortus* sp. n.). All Φ_{ST} values are significant (significance level $p \leq 0.05$) (Tab. 7).

Analysis of 28S rRNA gene for *M. aureus* subgroup included 127 sequences. The length of the sequences ranges from 584 to 588bp, while the length of the aligned sequences is 588bp. A total of 5 positions in the aligned sequence matrix are gaps. The total number of variable positions is 11 of which 7 are parsimony informative. The number of genotypes is 9 (Fig. 7, Tab. 8) and the genotype diversity (Gd) is 0.7082. The nucleotide diversity (Pi) is 0.00428. Median-joining network of 28S rRNA genotypes indicates certain deviations from the groups resolved by analyses of the COI gene sequences. *M. aureus* contains genotypes from I to V, *M. calidus* sp. n. I, VII, and IX, *M. ortus* sp. n. VIII, *M. unicolor* and *M. albidus* sp. n. share genotype VI (Fig. 7).

The analyses of COI gene sequences of ***Merodon caerulescens* complex** included a matrix of 13 sequences (1400bp in length). Additionally, the phylogenetic tree construction also included one sequence per each species from *Merodon aureus* subgroup. The MP and the ML trees have an identical topology (Fig. 8 and 9), while the topology of the NJ tree differs above all by the position of the clade which includes the representatives of *M. aureus* subgroup (Fig. P2 in Appendix 2). Average uncorrected p distance between species of *M. caerulescens* complex (*M. caerulescens* and *M. atricapillatus* sp. n.) is 0.7%. The sequences of *M. caerulescens* complex were partitioned into two groups corresponding to *M. caerulescens* and *M. atricapillatus* sp. n. (distance value of 0.001) using the ABGD software (Fig. 10). The same results were obtained by analyzing all three distance types (p distance, T92, and K80). The analyzed COI gene sequences comprise 16 variable positions of which 11 are parsimony informative. The total number of haplotypes is 9 (Table 9 and Table 10), the

haplotype diversity (Hd) is 0.949, the average number of differences (K) is 5.769, and the nucleotide diversity (Pi) is 0.00412 (Tab 9). Median-joining network of COI haplotypes of *Merodon caerulescens* complex clearly shows the grouping of haplotypes in two groups which are 7 mutational steps away from each other (Fig. 11). AMOVA confirms the genetic divergence shown in phylogenetic analyses and by the haplotype network construction. The value of the fixation index for the *M. caerulescens* complex is $\Phi_{ST}=0.80197$.

Analyses of 28S rRNA gene variability of *M. caerulescens* complex included 13 sequences. The length of the aligned sequences is 585bp. There is one variable and parsimony informative position which defines two different genotypes (Gd=0.5128). Genotype I is unique to *M. caerulescens*, while the genotype II is shared between *M. caerulescens* and *M. atricapillatus* sp. n. (Tab. 11, Fig. 12).

For ***Merodon cinereus* complex** the analyzed set of COI gene sequences includes 87 sequences with the length of 1321bp. The MP and the ML trees have an identical topology (*M. moesiacus* sp. n.+((*M. carpathicus* sp. n.)+((*M. cinereus*)+(*M. aff. cinereus*))+((*M. oromediterraneus* sp. n.)+(*M. iliricus* sp. n.))) (Fig. 13 and 14), while NJ is slightly different (Fig. 14, Fig. P3 in Appendix 2). Average p distances between species pairs of *M. cinereus* complex ranged from 0.5% between *M. cinereus* and *M. aff. cinereus* up to 1% between *M. carpathicus* sp. n. and *M. iliricus* sp. n., *M. carpathicus* sp. n. and *M. oromediterraneus* sp. n., *M. aff. cinereus* and *M. iliricus* sp. n., *M. cinereus* and *M. oromediterraneus* sp. n. (Tab. 12). The obtained ABGD results are similar for all three types of distances (identical for T92 and K80). The six groups were defined based on the distance values in the range 0.0010-0.0028. The groups obtained correspond to *M. moesiacus* sp. n., *M. carpathicus* sp. n., *M. cinereus*., *M. aff. cinereus*., *M. oromediterraneus* sp. n., and *M. iliricus* sp. n. (Fig. 15). Out of 1321 positions of the analyzed COI gene sequences 49 are variable, while 32 positions are parsimony informative. The total number of haplotypes is 31 (Tab. 13 and 14). The haplotype diversity (Hd) is 0.900, the average number of differences (K) is 8.260, and the nucleotide diversity (Pi) is 0.00625 (Tab. 13). The Median-joining network of COI haplotypes of the *Merodon cinereus* complex shows grouping of haplotypes into 6 groups (Fig. 16). AMOVA further confirms the genetic structure shown in phylogenetic analyses and by the haplotype network construction, $\Phi_{ST}=0.88048$. Φ_{ST} values obtained by comparing the species pairs were in the range from 0.81692 (*M. aff. cinereus* and *M. cinereus*) to 0.93353 (*M. carpathicus* sp. n. and *M. iliricus* sp. n.). All Φ_{ST} values were significant (significance level $p\leq 0.05$) (Tab. 15).

For *Merodon atratus* complex COI gene analyses included 49 sequences of 1313bp length. MP and ML tree construction methods resolve identical topology: (*M. balkanicus*)+((*M. atratus*)+(*M. virgatus*)) (Fig. 17 and 18). The bootstrap support values for the clades are lower on the MP tree (88, 62, 86) than the values on the ML tree (99, 87, 94). Additionally, a NJ tree has a slightly altered topology (*M. atratus*)+(*M. virgatus*) cluster is nested within *M. balkanicus*) comparing to MP and ML trees (Fig. P4 in Appendix 2). Average p distance values between species pairs of *M. atratus* complex ranged from 0.8% between *M. atratus* and *M. virgatus* to 1.4% between *M. virgatus* and *M. balkanicus* (Tab. 16). The ABGD analysis resulted in a partition into three groups for distance range from 0.0010 to 0.0046. Resolved groups match the species *M. balkanicus*, *M. atratus*, and *M. virgatus* (Fig. 19). Analyzed COI gene sequences have 28 variable positions, while 22 positions are parsimony informative. The total number of haplotypes is 15 (Tab. 17 and 18), the haplotype diversity is $Hd=0.83759$, the average number of differences is $K=8.20408$, and the nucleotide diversity is $Pi=0.00625$ (Tab. 17). *M. balkanicus*, *M. atratus* and *M. virgatus* COI haplotypes are grouped into individual groups on the *Median-joining* network (Fig. 20). AMOVA indicated significant interspecies variability. 94.06% of the total genetic variability of the complex is interspecies variability. Significant Φ_{ST} values (significance level $p\leq 0.05$) were calculated by comparing the pairs of species *M. balkanicus*/*M. atratus*, *M. balkanicus*/*M. virgatus* and *M. atratus*/*M. virgatus* (Tab. 19).

The *Merodon aerarius* COI gene sequences analyses included 77 sequences of 1321bp length. Out of 34 variable positions 23 were parsimony informative. A total number of haplotypes is 27 (Tab. 19, Fig. 19), the haplotype diversity is $Hd=0.884$, the average number of differences is $K=4.064$, and the nucleotide diversity is $Pi=0.00308$ (Tab. 20). The *Median-joining* haplotype network indicates grouping of haplotypes from the related sampling areas (Tab. 21, Fig. 21). AMOVA showed that 66.24% of the total species variability make the variability among the defined *Merodon aerarius* populations, while 33.76% is the intrapopulation variability. Fixation index is $\Phi_{ST}=0.66242$. Statistically significant differences between populations in each population pair, except Sardinia/Corsica and Morinj/Orjen (significance level $p\leq 0.05$) were detected (Tab. 22).

The analyses of the 28S rRNA gene for the *Merodon cinereus* subgroup included 206 sequences. Aligned sequences do not contain gaps and the total length of the sequences is 578bp. The total number of variable positions is 5 and all of them are parsimony informative. 5 genotypes have been defined (Fig. 22, Tab. 23) and the genotype diversity (Gd) is 0.628.

The nucleotide diversity (P_i) is 0.00292. The presented Median-joining network of 28S genotypes shows the separation between *M. cinereus* complex and *M. atratus* complex, while the species *M. aerarius* share 28S rRNA genotype with *M. atratus* complex specimens (Fig. 22).

A set of 83 combined COI gene sequences of 1271bp length were analyzed for ***Merodon luteomaculatus* complex**. 154 positions out of 1271 are variable, while from this number 141 positions are parsimony informative. The constructed MP, ML and NJ phylogenetic trees are similar in topology (Fig. 23, Fig. 24, Fig. P5 in Appendix 2). The two main clusters are resolved on the phylogenetic trees, one corresponds to *M. naxius* and the second includes all other species of *M. luteomaculatus* complex. Within the second main cluster, *M. luteomaculatus* and *M. euri* form one clade, while *M. andriotes*, *M. peloponnesius* and *M. erymanthius* are clearly separated into monophyletic clades. The average p distance between species of *M. luteomaculatus* complex ranged from 0.3% between *M. luteomaculatus* and *M. euri* up to 9.3% between pair *M. luteomaculatus* and *M. naxius*, and the pair *M. peloponnesius* and *M. naxius* (Tab. 24). The four groups corresponding to *M. luteomaculatus*+*M. euri*, *M. peloponnesius*+*M. erymanthius*, *M. andriotes* and *M. naxius* are resolved in ABGD analysis of p distance values, for distance range 0.001-0.0028 (Fig. 25A). Using the T92+G (Fig. 25B) and K80 distances for the distance value of 0.0017 four groups were obtained in primary and five in the recursive partitioning. The groups correspond to *M. luteomaculatus*+*M. euri*, *M. peloponnesius*, *M. erymanthius*, *M. andriotes* and *M. naxius*. The total number of haplotypes is 45 (Tab. 25 and 26), the haplotype diversity is $H_d=0.95886$, the average number of differences is $K=6.74082$, and the nucleotide diversity is $P_i=0.01743$ (Tab. 25). The Median-joining haplotype network also shows the grouping of haplotypes into 5 groups (Tab. 26, Fig. 26). AMOVA analysis confirmed the genetic structure that was determined by phylogenetic analyses and the haplotype network construction. The fixation index value for the *M. luteomaculatus* complex is $\Phi_{ST}=0.92091$. Φ_{ST} values obtained through comparison of species pairs are in the range from 0.29777 (*M. luteomaculatus* and *M. euri*) to 0.99412 (*M. peloponnesius* and *M. naxius*). All Φ_{ST} values are significant (significance level $p \leq 0.05$) (Tab. 27).

ISSR profiles were determined for 31 samples of six species of *M. luteomaculatus* complex. Generated ISSR gel profiles included bands in the range from 210bp to 2.500bp (Fig. 27), from which the 21 readable band positions were detected. The AMOVA analysis confirmed a high interspecies variability (86.24%) with F_{ST} value of 0.86236 indicating

statistically significant differentiation ($p < 0.05$). The detected intraspecies variability was 13.76%. The UPGMA cluster analysis based on the Nei-Li genetic distance coefficient provided five clusters corresponding to *M. euri*, *M. luteomaculatus*, *M. erymanthius*, *M. naxius* и *M. peloponnesius*+*M. andriotes* (Fig. 28). Bayesian cluster analysis included in the STRUCTURE program confirmed the most probable K value, K=2, while the second peak was determined for the value K=5 (Fig. 29A). For K=2, *M. euri* forms a single cluster, while all other taxa form a second cluster (Fig. 29B). For K=5, the samples are divided into five clusters (Fig. 29B) corresponding to the clusters obtained on the Nei-Li UPGMA tree (Fig. 28).

***Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* and *M. ambiguus* complexes** are analysed together. The analyses included 136 sequences obtained by combining the 3' and 5' COI sequences. The total sequence length is 1395bp. MP, ML and NJ phylogenetic tree construction methods resulted in similar tree topologies (Fig. 30, Fig. 31 and Fig. P6 in Appendix 2) and resolved two main clusters. The first cluster consists of two clades, one of these corresponds to *M. subnigrum* sp. n. and the other to *M. ambiguus*+*M. bozdagensis* sp. n. Within the second cluster, 5 clades can be distinguished: *M. quercetorum*+*M. legionensis*, *M. bessarabicus*, *M. cyprensis* sp. n., *M. ispartensis* sp. n. and *M. sapphous*. But, there are two specimens of *M. ispartensis* sp. n. placed within *M. sapphous* clade. Average p distance values between pairs of species from *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* and *M. ambiguus* complexes as well as the distances between each of the species from these three complexes compared to *M. quercetorum* and *M. legionensis* ranged from 0.1% between *M. ambiguus* and *M. bozdagensis* sp. n. up to 8.9% between *M. ambiguus* and *M. ispartensis* sp. n., *M. ispartensis* sp. n. and *M. subnigrum* sp. n., *M. ispartensis* sp. n. and *M. bozdagensis* sp. n., as well as the pair *M. sapphous* and *M. bozdagensis* sp. n. (Tab. 28). The ABGD sequence analysis of the *Merodon bessarabicus* complex separated the species *M. bessarabicus* and *M. subnigrum* sp. n. for the given distance range 0.001-0.0599 (0.1 for p distance). Similarly, in *M. sapphous* complex species *M. sapphous*, *M. bozdagensis* sp. n. and *M. cyprensis* sp. n. were confirmed (distances: 0.001 - 0.0028, identical to p distance, T92 and K80). Sequences of the *M. ambiguus* complex are grouped into two groups corresponding to the species *M. ambiguus* and *M. ispartensis* sp. n. for distance values 0.0129-0.0599 (identical for p distance, T92+G (G=0.05) and K80). For the distance values 0.001-0.0077 initial (T92+G (G=0.05) and K80) or recursive (p distance) partitioning resulted in three groups where the third group comprised AU472 and AU477 sequences from *M. ispartensis* sp. n. (Fig. 32). Out of 1395 analyzed

positions 200 were variable, while 190 were parsimony informative. A total number of the haplotypes is 57 (Tab. 29 and 30). The haplotype diversity is $Hd=0.96939$, the average number of differences is $K=71.97418$, and the nucleotide diversity is $Pi=0.05159$ (Tab. 29). The Median-joining network of COI haplotypes resolve *M. ambiguus*+*M. bozdagensis* sp. n. as one haplotype group (Tab. 30, Fig. 33). AMOVA analysis confirmed the genetic structure of analysed representatives of *Merodon bessarabicus* subgroup. The value of the fixation index is $\Phi_{ST}=0.97016$. By comparing the pairs of species, the following range of Φ_{ST} values are calculated: from 0.15170 (*M. ambiguus* and *M. bozdagensis* sp. n.) to 0.99707 (*M. bessarabicus* and *M. cyprensis* sp. n.). All Φ_{ST} values are significant (significance level $p\leq 0.05$) (Tab. 31).

Analyses of the 28S rRNA gene for the *Merodon bessarabicus* subgroup included 213 sequences. Length of aligned sequences is 581bp. The total number of analyzed positions without gaps is 577bp. The total number of variable positions is 7 of which 6 are parsimony informative. 11 genotypes are defined (Table 32), and genotype diversity (Gd) is 0.8413. The nucleotide diversity (Pi) is 0.00209. In total, 7 genotypes are unique to species: *M. bessarabicus* (IV), *M. subnigrum* sp. n. (V), *M. quercetorum* (VI, VII), *M. legionensis* (VIII), *M. erymanthius* (IX) and *M. luteomaculatus* (X). Genotype I is shared between *M. bozdagensis* sp. n. and *M. cyprensis* sp. n., genotype II is shared among the species *M. sapphous*, *M. bozdagensis* sp. n. and *M. cyprensis* sp. n., genotype III is shared between the species *M. ambiguus* and *M. ispartensis* sp. n., and genotype XI is shared among the species *M. euri*, *M. peloponnesius*, *M. naxius* and *M. andriotes* (Fig. 34).

Analyses of the combined 3' and 5' COI gene sequences of the *Merodon chalybeus* complex included 52 sequences. The trees with almost identical topology were obtained using MP, ML and NJ methods of tree construction (Fig. 35, 36, P7 in Appendix 2). Two main clades are clearly distinguished on all trees, the first one covering *M. chalybeus*, and the second comprises *M. minutus* and *M. paulum* sp. n. The clades are supported with high bootstrap values on all trees. Additionally, within the second main clade, *M. minutus* clade is nested within *M. paulum* sp. n. and has high nodal bootstrap support value (98/93/100). The average p distance values between pairs of the *Merodon chalybeus* complex species ranged from 1.2% between *M. minutus* and *M. paulum* sp. n., 4.2% between *M. chalybeus* and *M. paulum* sp. n., up to 4.6% between *M. chalybeus* and *M. minutus* (Tab 33). By ABGD analysis, sequences of the *Merodon chalybeus* complex are partitioned into two groups corresponding to *M. chalybeus* and *M. minutus*+*M. paulum* sp. n. (0.0077-0.0129 for p

distance and K80; 0.0129-0.1 for T92+G, G=0.05). Grouping into a higher number of groups for the lower values of the given distances does not match the presumed species boundaries (Fig. 37). Out of 1401 positions of the analysed COI gene sequences 112 are variable, while 88 positions are parsimony informative. The total number of haplotypes is 35 of which 19 belongs to *M. chalybeus*, 11 to *M. minutus* and 5 haplotypes to *M. paulum* sp. n. (Tab. 34 and 35). The haplotype diversity (Hd) of the complex is 0.97059, the average number of nucleotide differences (K) is 36.18100, and the nucleotide diversity (Pi) is 0.02583 (Tab. 34). *M. chalybeus* COI haplotype group and haplotype group *M. minutus*+*M. paulum* sp. n. are separated by 51 mutational steps on the Median-joining network. Haplotype group *M. minutus* is separated from *M. paulum* sp. n. group by 8 mutational steps. There are no shared haplotypes between species (Fig. 38). The AMOVA analysis tested the genetic structure shown in phylogenetic analyses and by the haplotype network construction. The fixation index value, Φ_{ST} between species is 0.88609. The obtained Φ_{ST} values between species pairs are in the range from 0.79473 (*M. minutus* and *M. paulum* sp. n.) to 0.90042 (*M. chalybeus* and *M. minutus*). All Φ_{ST} values are statistically significant (significance level $p \leq 0.05$) (Tab. 36).

Analyses of the 28S rRNA gene of the *Merodon chalybeus* complex included 38 sequences. The length of the sequence is between 545-550bp, while the length of the aligned sequences is 550bp. There are 2 variable positions informative for parsimony. Six genotypes have been defined (Fig. 39, Tab. 37). The genotype diversity (Gd) is 0.7112 and the nucleotides diversity (Pi) is 0.00062. Genotypes I, II and III are unique for *M. chalybeus*, genotype IV for *M. minutus*, and genotypes V and VI for *M. paulum* sp. n. (Fig. 39).

For the analysis of ***Merodon dobrogensis* subgroup**, 37 COI gene sequences were used. The total length of the aligned sequences is 1400bp. The MP and NJ methods resulted in identical tree topologies, (*M. rojoi* sp. n.)+((*M. puniceus*)+(*M. dobrogensis*)), with some differences in the bootstrap support values for species clades (*M. puniceus* 59/62 and *M. dobrogensis* 81/58) (Fig. 40, Fig. P8 in Appendix 2). The topology of the ML tree is similar, but the *M. dobrogensis* clade is nested within *M. puniceus* clade and has high bootstrap support (90) (Fig. 41). Average p distance values between species pairs of *Merodon dobrogensis* subgroup ranged from 0.8% between *M. puniceus* and *M. dobrogensis* to 8.8% between *M. rojoi* sp. n. and *M. dobrogensis* (Tab. 38). Groups determined by ABGD analysis for given distance values 0.0017 (p distance, K80) and 0.0017-0.0028 (T92+G, G=0.12) correspond to the species *M. rojoi* sp. n. , *M. puniceus* and *M. dobrogensis* (Fig. 42). Out of a

total of 1400 positions of the analyzed COI gene sequences 144 are variable and from this number 133 positions are parsimony informative. The total number of haplotypes is 19 of which 6 belongs to *M. rojoi* sp. n., 5 belongs to *M. puniceus* and 8 belongs to *M. dobrogensis* (Tab. 39 and 40). The haplotype diversity (Hd) is 0.93694, the average number of differences (K) is 53.47147, and the nucleotide diversity (Pi) is 0.03819 (Tab. 39). *M. rojoi* sp. n. haplotype group is separated from the other two species of *Merodon dobrogensis* subgroup by 117 mutational steps on Median-joining COI haplotype network. Haplotypic groups corresponding to *M. dobrogensis* and *M. puniceus* are separated by 7 mutational steps (Fig. 43). The genetic structure shown in phylogenetic analyses and by haplotype network construction was additionally tested in the AMOVA analysis. The Φ_{ST} value between the species is 0.96279. The range of Φ_{ST} values from 0.74597 (*M. puniceus* and *M. dobrogensis*) to 0.97425 (*M. rojoi* sp. n. and *M. dobrogensis*) were obtained by comparing the species pairs. All Φ_{ST} values are significant (significance level $p \leq 0.05$) (Table 41).

Analysis of the 28S rRNA gene for *M. dobrogensis* subgroup included 35 sequences. The length of the sequences ranges from 578-579bp, while the length of the aligned sequences is 579bp. The total number of variable positions is 3 and all are parsimony informative. Two genotypes have been defined (Fig. 44, Tab. 42), and the genotype diversity (Gd) is 0.393. The nucleotides diversity (Pi) is 0.00204. Genotype I is shared between species *M. dobrogensis* and *M. puniceus*, while genotype II is unique to *M. rojoi* sp. n. and separated by 3 mutational steps from genotype I (Fig. 44).

COI ML tree has been constructed for all of the analyzed specimens of the ***Merodon aureus* group**. The analysis included 718 combined (3' and 5') COI gene sequences of 1260bp length. A total of 27 monophyletic clades corresponding to the previously described and/or newly discovered species are defined. Of these, 4 clades have bootstrap support values in the range 60-80, 8 in the range 81-94 and 15 in the range 95-100. Species *M. quercetorum* and *M. legionensis* are resolved as one clade with a bootstrap support value of 100. Out of 11 morphologically defined complexes two are defined as monophyletic: *M. chalybeus* complex and *M. caeruleus* complex (Fig. 45). The ML analysis of the whole *Merodon aureus* group was also applied to the combined COI+28S sequence set. A total of 664 combined sequences were analyzed and the length of the aligned sequences was 1845bp. It has been defined 32 monophyletic clades. 11 monophyletic clades are supported with bootstrap values 50-80, 6 with 81-94, 14 with 95-100, while for one (*M. euri*) bootstrap support is below 50. Monophyletic clades correspond to the previously described and/or newly discovered species

of *M. aureus* group. On the level of species complexes *M. chalybeus* complex and *M. caerulescens* are only resolved as monophyletic (*bootstrap* support values 52 and 100) (Fig. 46).

Additionally, the 28S rRNA gene sequences (665 sequences, the length of the aligned matrix is 555bp) of the whole *Merodon aureus* group were analyzed separately by the construction of the Median-joining network of 28S genotypes. On the presented network, it is possible to distinguish two major genotypic groups. The first is made of the genotypes of *M. aureus* complex, *M. unicolor* complex, *M. caerulescens* complex and *M. pumilus*, and the second is made of the genotypes of *M. atratus* complex, *M. cinereus* complex, *M. bessarabicus* complex, *M. sapphous* complex, *M. ambiguus* complex, *M. luteomaculatus* complex, *M. dobrogensis* complex, *M. quercetorum*, *M. legionensis*, *M. nisi* and *M. aerarius*. These two genotypic groups were separated by 7 mutational steps. The *M. chalybeus* complex genotypes (XIV-XIX) are positioned between the two main genotypic groups. Genotypes XIII and XX which correspond to *M. robustus* and *M. unguicornis* are isolated in relation to the above-mentioned groups (Fig. 47). All 28S genotypes of *M. aureus* complex, *M. unicolor* complex, *M. caerulescens* complex, *M. cinereus* complex, *M. sapphous* complex, *M. chalybeus* complex, *M. dobrogensis* complex, *M. pumilus*, *M. robustus* and *M. unguicornis* are unique for each of the complexes/species. The genotype XXI is shared among *M. atratus* complex, *M. luteomaculatus* complex, *M. bessarabicus* complex, *M. aerarius* and *M. nisi*. *M. atratus* complex and *M. ambiguus* complex share the genotype XXII, while *M. atratus* and *M. bessarabicus* share the genotype XXIII (Fig. 47, Tab. P2 in Appendix 4).

The COI haplotypes distribution map of the *Merodon aureus* group shows high diversity of COI accros sampling localities. The map contains a total of 164 sampling localities (Fig. 48), of which 15 in Serbia, 2 in Croatia, 2 in Bulgaria, 1 in Macedonia, 4 in Romania, 12 in Montenegro, 61 in Greece, 18 in Turkey, 4 in Iran, 1 in Cyprus, 7 in France, 2 in Switzerland, 4 in Austria, 14 in Italy, 13 in Spain, and 4 in Morocco. The largest number of sampling localities is in the area that includes the Balkan Peninsula, the islands of the Aegean Sea and the western and south-western part of Asia Minor, where representatives of all subgroups of the *M. aureus* group are present.

Testing for the presence of *Wolbachia* included 45 individuals of 41 different species of *Merodon aureus* group. A total of 42 sequences of the 16S rRNA gene of the bacteria and 35 sequences of *wsp* genes were produced. The length of the aligned sequences of the 16S rRNA gene was 412bp, the sequences were free of gap positions, while the AU360 sequence

was somewhat shorter (333bp). After the addition of the sequences from the GenBank and the outgroups the aligned sequence matrix comprised of 63 samples, and the length of the matrix was 415bp. The aligned sequences of the *wsp* genes contained gap positions, the total length of the sequences after alignment was 560 bp. BLASTing in the NCBI and sequences comparisons with the MLST *Wolbachia* database confirmed that the sequences belong to *Wolbachia*. Analysis of bacterial 16S rRNA gave positive results in 38 species, while *M. cyprensis* sp. n. (*M. sapphous* complex), *M. ortus* sp. n. (*M. aureus* complex) and *M. balkanicus* (*M. atratus* complex) were negative for the presence of *Wolbachia*. Based on 16S ML tree, it was confirmed that the species of *Merodon aureus* group were infected with A supergroup of *Wolbachia* (Fig. 49). Testing *wsp* gene confirmed the presence of *Wolbachia* in 32 species, among which are *M. cyprensis* sp. n. and *M. ortus* sp. n. For *M. nisi* no product was obtained after the *wsp* gene amplification reaction, while for *M. naxius*, *M. andriotes* (both from *M. luteomaculatus* complex) and *M. puniceus* (*M. dobrogensis* complex), multiple products of different lengths were obtained. *Wsp* sequences of following species: *M. albidus* sp. n. (*M. unicolor* complex), *M. cinereus* (*M. cinereus* complex), *M. aerarius* and *M. pumilus* were of poor quality and were not used in further analysis. Of all tested specimens, the absence of *Wolbachia* gene replication products was recorded only in *M. balkanicus* (*M. atratus* complex) (Tab. 43). In total seven *wsp* haplotypes were defined. Hap1 is the most widespread, while Hap5 is present only in species *M. bessarabicus*.

Discussion. In order to determine the molecular diversity of the *Merodon aureus* group, the sequence database of the COI gene and the 28S rRNA gene was formed. Sequences were analyzed for the purpose of determining the genetic variability and the possibility of application in the molecular taxonomy of the group. Additionally, the use of ISSR markers was tested on one of the species complexes (*M. luteomaculatus* complex).

Sequence processing, i.e. chromatogram analysis and sequence editing resulted in sequence matrices of different lengths due to trimming of the initial and final part of each sequence. Poor quality at the beginning and at the end of the readings is a consequence of the imperfection of the sequencing procedure and it is expressed in irregular peaks on the chromatogram and non-readable nucleotides. As the quality of the sequences differed between subgroups/species complexes, the length of the final sequence matrices used in the further analysis varied. In addition, 28S rRNA gene sequences contained the gap regions, which also had an impact on the length of the final matrices.

The values of the haplotype diversity (Hd) of COI gene were generally high in the analyzed subgroups/complexes (0.90029 - 0.97059). As the haplotypes diversity (Hd) presents the probability that two randomly sampled sequences are different (Nei, 1987), high values of this parameter indicate a high variability of the DNA sequence of the COI gene in different species, complexes and/or subgroups. At the group level, by analyzing the matrix of 718 combined COI gene sequences of 1260bp length, Hd value of 0.9917 was obtained.

The construction of the Median-joining network of COI haplotypes has shown that species within the complexes do not have identical haplotypes. However, in the case where three complexes were analyzed together, *Merodon bessarabicus*, *M. sapphous* and *M. ambiguus* complexes, it has been found that species belonging to different complexes may share common haplotypes (*M. ambiguus* and *M. bozdagensis* sp. n.). The presence of shared haplotypes may indicate mtDNA introgression, incomplete lineage sorting, but may also be the result of mtDNA manipulation due to infection with intracellular parasites, *Wolbachia*.

The AMOVA analysis of the COI gene sequences showed that most of the overall variability of subgroups/complexes of species is variability between species. The average values of p distance between species by subgroups/complexes ranged from 0.1% to 9.3%. However, in the majority of cases, the average p distance between the species of the same complex was within the range of 0.3% to 4.6%. The uncorrected p distance is calculated as the proportion of positions that differ between the two sequences being compared. In this case, possible multiple changes at the same position are ignored, and this value is only meaningful when the probability of the same is small. In order to make the distance calculation as precise as possible, it is often necessary to make corrections for multiple changes per position and taking into account the ratio of transitions and transversions. Different models of various complexity are used for evolutionary distance calculations and they have application in the construction of phylogenetic trees, species divergence time calculation and understanding the mechanism of evolution (Nei and Zhang, 2005).

The construction of phylogenetic trees is a graphic representation of the evolutionary history of the group of organisms or phylogeny. At the beginning of DNA barcode application, variability of the COI gene sequence was analyzed by construction NJ phylogenetic trees (Hebert et al., 2003a). The method, however, has been criticized as inadequate given that classical taxonomy uses character analysis, and the integration of the results of classical taxonomy and DNA analysis would be too complicated. It is recommended to use methods of character analysis, such as MP and ML (De Salle et al., 2005). These methods are also the

most common in the DNA of the syphidae taxonomy (e.g. Pérez-Bañón et al., 2003; Mengual et al., 2006; Ståhls et al., 2008; 2009; Marcos-García et al., 2011; Vujić et al., 2012; 2013; Grković et al., 2015, Achan et al., 2016, Šašić et al., 2016; Chroni et al., 2017; Radenković et al., 2018). In this study, all three methods were used to analyze the combined sequences of COI gene by complexes/subgroups in order to compare the resulting phylogenetic trees. All three methods resulted in phylogenetic trees of a similar or identical topology. For the construction of COI and COI+28S phylogenetic trees for the entire *Merodon aureus* group, the ML method was applied, since the RAxML 8.2.8 program enables rapid analysis of large matrix sequences (Stamatakis, 2014).

The statistical support values for the phylogenetic trees are determined using the bootstrap method. This method, together with reciprocal monophyly, is one of many which are used to test statistical support of clades in the process of species delimitation (Collins and Cruickshank, 2012). Applied tree construction methods were generally consistent in bootstrap support values of the clades, although some differences in values were present. According to Hillis and Bul (1993), the values of the bootstrap support above 70 are considered statistically significant and indicate a probability of over 95% that the clade is real. In the later literature, the bootstrap support values 70-95 are considered acceptable, while values of over 95 are taken for high-support values. Despite this trend in interpreting bootstrap support, there is no explicit reference to the appropriate threshold values, but low values do not necessarily have to be an indicator of mistakes in a tree topology. On the ML tree obtained by analyzing COI gene sequences of all *Merodon aureus* group specimens (Fig. 45), 28 monophyletic clades corresponding to species were detected, and 15 has a bootstrap support ≥ 95 . A small number of clades with high bootstrap support is explained by the fact that species are closely related and probably have a short independent evolution. Namely, it is possible that in cases of recently diverged sister species the clade support is low, even if they are morphologically distinct and have unique mutations (Collins and Cruickshank, 2012). Among the mentioned monophyletic clades, there are those who did not satisfy the requirement of reciprocal monophyly (e.g. *M. naxius*), what is probably associated with a short independent species evolution, but may also be a consequence of inequality of the number of samples between species. The same applies to the combined COI+28S tree.

The determination of the presence of DNA barcoding gap was performed on the basis of the established distance values between the COI gene sequences. The analysis was performed by calculating three different types (uncorrected p distance, distance calculated

according to best substitution model, K80 distance - originally proposed for use in DNA barcoding studies by Hebert et al., 2003a) of distances in order to observe the dependence of the results on the distance type. The number of defined groups per complex is considered relevant if it coincides with the number of species determined by the construction of phylogenetic trees. Coincidence has been established for the most of the species complexes when p distance is used, except in the case of *Merodon luteomaculatus* complex and *M. chalybeus* complex. For distances calculated using the K80 or the best nucleotide substitution model, the number of defined groups deviated in the case of *M. aureus* complex, *M. bessarabicus* complex, and *M. chalybeus* complex. In the case of *M. chalybeus* complex, the results of the ABGD analysis with all applied distance types did not support the division of species shown on phylogenetic trees. For most complexes, there was consistency in the results for all three types of distances in terms of the coincidence of the number of groups (defined by initial or recursive partitioning) with the number of species determined on the basis of phylogenetic trees analysis. However, there was a certain variation in the range of the distance values at which the DNA barcode gap was resolved. According to Collins et al. (2012), the substitution model does not significantly affect the distance values within the species when these values are low, and this could explain the consistency of the results in most of the analyzed species complexes.

Sequence analysis of the 28S rRNA gene showed that the analyzed region of this gene was much less variable compared to the variability of the COI gene. This result is expected since the 28S rRNA genes are commonly used in the molecular analysis of higher taxonomic categories (Hwang and Kim, 1999; Patwardhan et al., 2014). Sequences were analyzed by subgroups (*Merodon aureus* subgroup, *M. cinereus* subgroup, *M. bessarabicus* subgroup, *M. dobrogensis* subgroup) and for *Merodon caerulescens* complex and *M. chalybeus* complex. The smallest number of genotypes, only two, were found in *M. caerulescens* complex and *M. dobrogensis* subgroups, and the largest number (11) in *M. bessarabicus* subgroups. The genotype diversity values were lower in relation to the COI gene and in the range of 0.393 (*M. dobrogensis* subgroup) to 0.8413 (*M. bessarabicus* subgroup). The success of the COI gene sequences and the 28S rRNA gene sequences in species delimitation by complexes/subgroups of the *M. aureus* group is summarized in Figure 51, but for 28S rRNA gene sequences, it is determined only on the basis of the presence of unique and shared genotypes assuming low sequences variability. Additionally, the construction of the Median-joining network of 28S rRNA gene genotypes of the entire *M. aureus* group showed the absence of common

genotypes for most of the complexes (except for *M. bessarabicus* complex, *M. luteomaculatus* complex, *M. atratus* complex, and the species *M. aerarius* and *M. nisi*).

In addition to analysis of COI and 28S rRNA gene sequences, the application of ISSR markers in the *Merodon aureus* group taxonomy was also tested. ISSR markers can be successfully applied to separate insect's species and populations (e.g. Abbot, 2001; Luque et al., 2002; Dušinský et al., 2006; Kehlmaier et al., 2010; Stähls et al., 2016; Radenković et al., 2018). Luque et al. (2002) have shown that these markers can be successfully applied to the separation of morphologically similar species in the family Lepidoptera. In the case of closely related species with a short independent evolutionary history, these markers can be significant for resolving their taxonomy, since they are fast-evolving loci (Kehlmaier et al., 2010). In this study, the ISSR markers proved useful for species delimitation within the *M. luteomaculatus* complex and enabled clear delimitation of the 4 species. Two species, *M. peloponnesius* and *M. andriotes* were not successfully separated (Fig. 51). This is most likely due to a chosen range of bands length within which the ISSR profiles were read. In addition, ISSR profiles were obtained by using only one microsatellite primer (GACA)₄, and it is possible that the choice of another would result in a somewhat different variability scheme due to the different presence of various repetitive motives in the genome (Abbot, 2001; Luque et al., 2002; Dušinský et al., 2006). The effectiveness of the analyzed markers in the separation of *M. luteomaculatus* complexes is summarized in Figure 51.

Despite the simplicity of procedures and the cost-effectiveness of using ISSR markers, there are certain limitations. ISSR markers are dominant markers and as such produce less genetic information per locus relative to codominant markers. This restriction can be overcome by applying a larger number of loci. Because of their dominance, they are not the best choice for assessing genetic diversity, but they can be successfully applied to determine population structure and genetic differentiation among populations. Profiles reading can be subjective, and the profiles may vary depending on the equipment and protocol used. To overcome this problem, it is necessary to read only clear bands within a predetermined band length range, and in order to compare the results, it is necessary to respect the identical protocol for obtaining the ISSR profiles (Ng and Tan, 2015).

The results show that almost all of the analyzed species of the *Merodon aureus* group, with the exception of *M. balkanicus*, are infected with *Wolbachia*. However, this is not the first case of detected infection in the syrphids despite the fact that it has not caused much attention so far (Werren and Windsor 2000, Sintupachee et al., 2006; Evison et al., 2012).

ML analysis of the 16S rRNA gene sequences confirmed that the samples of *Merodon aureus* species group were infected with *Wolbachia* supergroup A. The success of *Wolbachia* detection was similar when comparing PCR amplification results for two applied molecular markers, 16S rRNA gene and *wsp* gene. In both cases, 42 out of 45 analyzed samples received amplification products, for one sample (*M. balkanicus* specimen) no product was obtained for one of the analyzed loci, while only four of the samples were successfully produced. In the case of multiplication of the sequence of the *wsp* genes, multiple bands in three samples were detected indicating possible multiple infections with different strains of the bacterium. These products are not further analyzed, given the economic limitations of the research. When we talk about the quality of the produced sequences, 10% *wsp* sequences were excluded from further analysis due to poor quality, while all 16S produced sequences were of satisfactory quality. Poor quality of the sequences can be the result of multiple infections with different bacterial strains, but may also be the result of contamination of the samples. The obtained results indicate a high rate of representation and a *Wolbachia* infection of 97.7%. According to Jeyaprakash and Hoy (2000), the infection rate in arthropods is 76%.

Based on the division given by Šašić et al. (2016) within the *Merodon aureus* group it is possible to distinguish 5 subgroups: *M. aureus* subgroup, *M. bessarabicus* subgroup, *M. chalybeus* subgroup, *M. cinereus* subgroup and *M. dobrogensis* subgroup. In this study, each of the subgroups was analyzed using COI and 28S rRNA gene sequences. Within the subgroup morphological complexes of species were defined (based on the determination of Prof. Dr Ante Vujić and the publications: Šašić et al. (2016), Veselić et al. (2017) and Radenković et al. (2018)). The complexes comprise of 2-6 cryptic and closely related species which have been established by applying molecular methods. The analyses included 42 previously described and/or newly discovered species.

***Merodon aureus* subgroup.** Based on the sequences of COI gene *M. aureus* complex is defined as a complex of three cryptic species: *M. aureus*, *M. calidus* sp. n. and *M. ortus* sp. n., whereas *M. unicolor* complex is defined as a complex of two cryptic species: *M. unicolor* and *M. albidus* sp. n. The division of *M. aureus* complex into three species was also indicated based on 28S sequences, with an explanation of the shared genotypes between species of *M. aureus* complex as a consequence of introgression between the species *M. aureus* and *M. calidus* sp. n. The species from *M. unicolor* complex share one genotype.

Based on the COI results, it has been determined that the ***Merodon caerulescens* complex** consists of two island species *M. caerulescens* from the island of Rhodes and *M.*

atricapillatus sp. n. from the island of Crete. However, the 28S sequences did not prove to be variable enough to confirm the species status.

***Merodon cinereus* subgroup** contains two complexes of species. The *M. atratus* complex was confirmed by the analysis of the COI sequence as a complex of species: *M. atratus*, *M. balkanicus* and *M. virgatus*. COI sequences analysis of the *M. cinereus* complex indicates the possible presence of 6 cryptic taxa: *M. moesiacus* sp. n. (*M. cinereus* C according to Milankov et al., 2008), *M. carpathicus* sp. n., *M. cinereus*, *M. aff. cinereus*, *M. oromediterraneus* sp. n. (*M. cinereus* A according to Milankov et al., 2008) and *M. iliricus* sp. n. However, the status of species must be confirmed by additional evidence, both molecular and evidence of other scientific disciplines. The 28S rRNA gene sequences did not prove to be significant for resolving taxonomy in this subgroup. *M. aerarius*, which is a species outside the complexes, has distribution in the mountain areas of the Balkan and Apennine peninsulas, as well as on the islands of Sardinia and Crete. In spite of similar distribution with previously mentioned complexes, this species does not show COI and 28S divergence that would indicate a cryptic speciation. The exact cause of the absence of speciation is unknown and stands as a challenge for further research.

***Merodon bessarabicus* subgroup** comprise 4 complexes of cryptic species (*M. luteomaculatus* complex, *M. bessarabicus* complex, *M. ambiguus* complex, *M. sapphous* complex) and 5 additional species outside these complexes (*M. adriaticus*, *M. flavicornis*, *M. quercetorum*, *M. legionensis*, *M. rufipes*). Genetic analysis based on the divergence of COI and 28S sequences indicated the *Merodon luteomaculatus* complex as a complex of six cryptic types: *M. luteomaculatus*, *M. euri*, *M. peloponnesius*, *M. erymanthius*, *M. andriotes* and *M. naxosi*. Based on the genetic analysis of COI and 28S sequences we can present a hypothesis about the possible existence of two cryptic species within *Merodon bessarabicus* complex (*M. bessarabicus* and *M. subnigrum* sp. n.), 3 cryptic species within *M. sapphous* complex (*M. sapphous*, *M. bozdagensis* sp. n. and *M. cyprensis* sp. n.), and 2 cryptic species within *M. ambiguus* complex (*M. ambiguus* and *M. ispartensis* sp. n.). The genetic divergence shown by the analysis of the COI gene was often higher among species of the same complex than between the species of different complexes.

***Merodon chalybeus* complex** consists of species *M. chalybeus*, *M. minutus* and *M. paulum* sp. n. The species were resolved by the analysis of COI and 28S rDNA sequences. The analysis of the 28S sequences has shown that each species has only unique genotypes, what supports their genetic differentiation.

***Merodon dobrogensis* subgroup** includes species *M. rojoi*, *M. puniceus* and *M. dobrogensis*. The latter two make *M. dobrogensis* complex. These species are resolved using COI sequences, while 28S sequences are not sufficiently variable for their delimitation.

In all analyzed complexes, the COI divergence values (p distances) between species are in the range of values recorded for cryptic, closely related hoverfly species (Marcos-García et al., 2011; Vujić et al., 2013; Popović et al., 2015, Nedeljković et al., 2015). Speciation events within the complexes may be explained in light of the geological history of the Mediterranean region, drastic climate changes during the Pleistocene and island type habitat fragmentation.

ML analysis of all COI gene sequences obtained for the entire *Merodon aureus* group resolved a total of 27 taxa as monophyletic. On the level of complexes, COI gene has proved inadequate in determining the monophyletic origin of the complexes, since only two (*M. caerulescens* complex and *M. chalybeus* complex) form monophyletic clades on the ML tree (Fig. 45). A slightly better resolution is obtained if 28S rRNA gene sequences are included in the analysis and combined with the COI gene sequences. In this way, 32 species were confirmed as monophyletic, but at the level of complexes there are no changes (Fig. 46). An independent analysis of Median-joining network of 28S genotypes shows a potential in complex delimitation given the absence of shared genotypes between most of the complexes (7 out of 11).

Analyses of all the obtained COI gene sequences and the combined COI+28S sequences did not resolve phylogeny of the group. Phylogenetic trees indicate the frequency of paraphyly and polyphyly of the species within *Merodon aureus* group. Introgression and incomplete lineage sorting, which follow the recent speciation are often the main causes of species polyphyly (Funk and Omland, 2003; Harrison and Larson, 2014). However, when we talk about *M. aureus* group, there is the possibility of an additional genetic effect of *Wolbachia* infection on mtDNA.

Conclusion. Molecular diversity of the species from *Merodon aureus* group was studied by analyzing the variability of the COI gene and 28S rRNA gene sequences and the sequence database for these genes is formed. The results indicated presence of cryptic species complexes within *M. aureus* group. The speciation was probably conditioned by the geological history of the Mediterranean region, drastic climate changes during the Pleistocene and island type habitat fragmentation.

This study confirmed the high molecular diversity of the *Merodon aureus* group for the analyzed mitochondrial marker, COI gene. Nevertheless, phylogenetic relationships between species are not clearly resolved on the basis of the COI gene analysis nor in a combined analysis with 28S rRNA gene sequences. 28S rRNA gene sequences have in most cases proved to be conservative for determining divergence between species, but can be useful in defining complexes or subgroups. The ISSR proved to be a potentially significant marker for the taxonomy of the group. In addition, the presence of endosymbiotic bacteria from the genus *Wolbachia* has been shown in all of the analyzed species except *M. balkanicus* what can influence the evolution of mtDNA and contribute to the formation of illogical connections on the phylogenetic trees. However, no clear relation was established between the sequence variability of the mitochondrial COI gene and the infectious status of species. Since most of the complexes involve closely related species with a short independent evolution, processes such as introgression and incomplete lineage sorting may further mask the real picture of evolutionary relationships among species. In order to confirm the status of newly discovered species, it is recommended to combine these results with the analysis of additional molecular markers, morphological data, morphometry, ecological data and all other relevant information in the spirit of integrative taxonomic approach.

Биографија



Љиљана Шашић Зорић рођена је 30. октобра 1988. године у Вуковару, Република Хрватска. Основне и мастер академске студије похађала је на Природно-математичком факултету у Новом Саду, Департман за биологију и екологију, смер Биолог - молекуларни биолог. Основне академске студије завршила је 2011. године просечном оценом 9,97. Дипломске академске студије Мастер биолог - молекуларни биолог завршила је 2012. године 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. Докторске академске студије из научне области Биологија (ужа научна област Генетика) уписала је 2012. године на Природно-математичком факултету у Новом Саду, Департман за биологију и екологију. Све предвиђене испите на докторским студијама положила је просечном оценом 10,00.

Од 2013. до 2017. године била је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја на научном пројекту “Конзервациона стратегија за очување заштићених и строго заштићених врста у Србији - осолике муве (Diptera: Syrphidae) као модел организми” (ОИ 173002). Од априла 2017. године запослена је на Био Сенс Институт у Новом Саду, у звању истраживач сарадник. Оријентисана је на истраживање генетичке варијабилности природних популација различитих врста осоликих мува (Diptera: Syrphidae) применом молекуларних маркера, са посебним освртом на род *Merodon*.

У 2016. и 2017. години три пута је боравила на стручном усавршавању у ДНК лабораторији Природњачког музеја, при Универзитету у Хелсинкију, Финска. Почетком 2017. године била је у истраживачкој посети на Универзитету у Аликантеу, Шпанија, а крајем исте године у краткој истраживачкој посети на Универзитету у Вахенингену, Холандија.

Добитница је краткорочне стипендије Ентомолошког друштва у Хелсинкију и Друштва за заштиту Финске флоре и фауне, у 2017. години.

Своје научне резултате публиковала је у 3 научна рада објављена у међународним часописима и 16 саопштења са скупова међународног и националног значаја.

Члан је Друштва генетичара Србије и Српског биохемијског друштва.



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ • ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ
ФАКУЛТЕТ

21000 Нови Сад, Трг Доситеја Обрадовића 2

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	Монографска документација
Тип записа, ТЗ:	Текстуални штампани материјал
Врста рада, ВР:	Докторска дисертација
Аутор, АУ:	Љиљана Шашић Зорић
Ментор, МН:	Проф др. Михајла Ђан, др Gunilla Ståhls-Mäkelä
Наслов рада, НР:	Молекуларни диверзитет <i>Merodon aureus</i> групе (Diptera: Syrphidae)
Језик публикације, ЈП:	Српски језик / ћирилица са проширеним изводом на Енглеском језику
Језик извода, ЈИ:	Српски/Енглески језик
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	АП Војводина
Година, ГО:	2018.
Издавач, ИЗ:	Ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Нови Сад, Департман за биологију и екологију, ПМФ, Трг Доситеја Обрадовића 2
Физички опис рада, ФО:	поглавља (11), страна (220), цитата (158), табела (47), слика (65), прилога (5), продужени абстракт на енглеском (1)
Научна област, НО:	Биологија
Научна дисциплина, НД:	Генетика
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	СОI ген, 28S рРНК ген, осолике муве, <i>Merodon aureus</i> група
УДК:	
Чува се, ЧУ:	Библиотека Департмана за биологију и екологију, ПМФ, Трг Доситеја Обрадовића 2
Важна напомена, ВН:	Део експерименталних истраживања урађен је у ДНК лабораторије Природњачког музеја у Хелсинкију, Финска.



Извод, ИЗ:

Род *Merodon* Meigen (Diptera: Syrphidae) се одликује великим бројем врста које имају функцију у опрашивању биљака. У оквиру овог рода својом разноврсношћу издваја се *Merodon aureus* група врста коју поред фенотипски различитих одликује и присуство већег броја криптичних врста. Због велике морфолошке сличности криптичне врсте представљају изазов за таксономе, те су молекуларне методе од посебног значаја. У том светлу примарни циљ овог истраживања је био утврђивање молекуларног диверзитета групе и могућности његове примене у таксономији. Истраживање је било засновано на анализи варијабилности секвенци COI и 28S рРНК гена за 718 јединки 41 описане или новоткривене врсте сирфида. Додатно, тестирана је примењивост мултилокусних ISSR маркера у раздвајању врста *M. luteomaculatus* комплекса. Узорци су тестирани и на присуство *Wolbachia* с обзиром да она може утицати на еволуцију митохондријалних гена. Добијени резултати су указали на високу варијабилност секвенци COI гена који се показао корисним у утврђивању граница криптичних врста у анализираним комплексима. Секвенце 28S рРНК гена у већини случајева нису биле од већег значаја за раздвајање врста, али би могле имати потенцијал у раздвајању комплекса или подгрупа врста као допуна анализи секвенци COI гена. Додатно, ISSR маркери су показали потенцијал за примену у молекуларној таксономији. Све анализиране врсте изузев *M. balkanicus* су биле заражене *Wolbachia*, али није утврђена јасна веза између варијабилности секвенци митохондријалног COI гена и инфекционог статуса врста. Утврђен образац генетичке варијабилности је вероватно обликован драстичним климатским променама током Плеистоцена и фрагментацијом хабитата. Да би се донели крајњи закључци о таксономском статусу предложених врста потребно је добијене резултате интегрисати са подацима других релевантних научних дисциплина.

Датум прихватања теме, ДП:

08.09.2016.

Датум одбране, ДО:



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ • ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ
ФАКУЛТЕТ

21000 Нови Сад, Трг Доситеја Обрадовића 2

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Чланови комисије, **КО**:

Председник: др Анте Вујић, редовни професор, ПМФ, Нови Сад

Члан: др Невена Величковић, доцент, ПМФ, Нови Сад

Члан: др Наташа Кочиш Тубић, научни сарадник, ПМФ, Нови
Сад

Члан: др Зорица Недељковић, научни сарадник, БиоСенс
Институт, Нови Сад

Ментор: др Михајла Ђан, редовни професор, ПМФ, Нови Сад

Ментор: др Gunilla Ståhls-Mäkelä, доцент, управник лабораторије,
Природњачки музеј, Хелсинки



UNIVERSITY OF NOVI SAD • FACULTY OF SCIENCES
21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO:	
Identification number, INO:	
Document type, DT:	Monograph type
Type of record, TR:	Printed text
Contents code, CC:	PhD thesis
Author, AU:	Ljiljana Šašić Zorić
Mentor, MN:	Prof dr. Mihajla Đan, dr Gunilla Ståhls-Mäkelä
Title, TI:	Molecular diversity of <i>Merodon aureus</i> species group (Diptera: Syrphidae)
Language of text, LT:	Serbian / Cyrillic with extended abstract in English
Language of abstract, LA:	Serbian / English
Country of publication, CP:	Republic of Serbia
Locality of publication, LP:	Vojvodina
Publication year, PY:	2018.
Publisher, PU:	Author's reprint
Publication place, PP:	Novi Sad, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 2
Physical description, PD:	chapters (11), pages (220), references (158), tables (47), figures (65), appendices (5), extended abstract in English (1)
Scientific field, SF:	Biology
Scientific discipline, SD:	Genetics
Subject/ Key words, S/KW:	COI gene, 28S rRNA gene, hoverflies, <i>Merodon aureus</i> group
Universal decimal classification, UDC:	
Holding data, HD:	The Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Serbia
Note, N:	A part of experimental studies was performed in DNA laboratory of the Finnish Museum of Natural History, Helsinki.



Abstract, **AB:**

Genus *Merodon* Meigen (Diptera: Syrphidae) is characterized by a large number of species which have a function in plants pollination. Within this genus, *Merodon aureus* species group is distinguished by its diversity and it is characterized not only by phenotypically divergent species but also with a large number of cryptic species. Because of the high morphological similarity, cryptic species are a challenge for taxonomist, thus molecular methods are of special importance. The primary goal of this research was to determine the molecular diversity of the group and the possibility of its application in taxonomy. The study was based on the sequences variability analysis of COI and 28S rRNA genes for 718 individuals belonging to 41 described or newly discovered hoverfly species. Additionally, the applicability in species delimitation of multilocus marker ISSR was tested on *M. luteomaculatus* species complex. Specimens have also been tested for *Wolbachia* since it may affect the evolution of mitochondrial genes. The obtained results indicated a high variability of the COI gene sequences that proved useful for determining the cryptic species boundaries in the analyzed complexes. Sequences of the 28S rRNA gene in most cases were not of much significance for the species delimitation, but they could have the potential to separate species complexes or subgroups as a complement to the analysis of the COI gene sequences. Additionally, the ISSR markers showed potential for application in molecular taxonomy. All analyzed species except *M. balkanicus* were infected with *Wolbachia*, but no clear relation was established between the sequence variability of the mitochondrial COI gene and the infectious status of species. The established pattern of genetic variability is probably shaped by drastic climatic changes during Pleistocene and habitats fragmentation. In order to achieve the final conclusions on the taxonomic status of the proposed species, it is necessary to integrate the obtained results with the data of other relevant scientific disciplines.

Accepted by the Scientific Board
on, **ASB:**

08.09.2016.

Defended on, **DE:**



UNIVERSITY OF NOVI SAD • FACULTY OF SCIENCES
21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2

KEY WORDS DOCUMENTATION

Thesis defend board, **DB**:

- President: dr Ante Vujić, full professor, Faculty of Sciences, Novi Sad
- Member: dr Nevena Veličković, assistant professor, Faculty of Sciences, Novi Sad
- Member: dr Nataša Kočiš Tubić, research associate, Faculty of Sciences, Novi Sad
- Member: dr Zorica Nedeljković, research associate, BioSense Institute, Novi Sad
- Mentor: dr Mihajla Đan, full professor, Faculty of Sciences, Novi Sad
- Mentor: dr Gunilla Ståhls-Mäkelä, docent, laboratory manager, Finnish Museum of Natural History, Helsinki