



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU



Dunja Popović

**Genetička karakterizacija kompleksa *Merodon avidus*
(Diptera: Syrphidae)**

-doktorska disertacija-

Novi Sad, 2019.

ZAHVALNICA

Eksperimentalna istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom urađena su, većim delom, u Laboratoriji za Genetiku, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Finansirana su od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u okviru projekta „Konzervaciona strategija za očuvanje zaštićenih i strogo zaštićenih vrsta u Srbiji - osolike muve (Diptera: Syrphidae) kao model organizmi” (OI173002). Deo istraživanja urađen je u Finskom muzeju nacionalne istorije, pri Univerzitetu u Helsinkiju, Finska, u okviru saradnje sa dr Gunillom Ståhls.

Neizmernu zahvalnost dugujem mojoj mentorki doc. dr Neveni Veličković za bezrezervnu podršku i svaku vrstu stručne pomoći, za dobronamerne savete i konstruktivne sugestije, koje mi je pružala tokom svih faza istraživačkog rada. Hvala na prenetom znanju, na ukazanom poverenju, na otvorenosti za svaku ideju, na srdačnom i prijateljskom odnosu. Najlepše hvala i za ogroman doprinos u laboratorijskom delu ovog istraživanja.

Zahvaljujem se prof. dr Anteu Vujiću, na ukazanoj prilici da budem deo njegov tima, na njegovoj spremnosti da mi pruži svaku vrstu saveta i odgovore na sva moguća pitanja, u svakom trenutku, nezavisno od geografskih odrednica. Hvala mu što je od prvoga trenutka saradnje verovao u mene i što mi je pomogao da, kroz različite životne faze, istrajem u cilju. Bez njegovog zalaganja i podrške ova disertacija ne bi bila realizovana.

Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Mihajli Đan i prof. dr Dragani Obreht-Vidaković na prilici da postanem istraživač Laboratorije za genetiku, te na ostvarenoj želji o daljem usavršavanju u ovoj biološkoj oblasti. Hvala na svemu što su me naučile, na uvek prisutnoj kolegijalnosti, razumevanju, prijateljskoj i profesionalnoj podršci.

Izuzetnu zahvalnost dugujem i prof. dr Dubravki Milić, koja mi je pružila neizmernu pomoć u oblasti modelovanja distribucije vrsta. Hvala na ogromnoj stručnoj i tehničkoj podršci, koja je značajno pojačala kvalitet navedenih analiza.

Hvala dr Jeleni Ačanski na pružanju obimnih informacija o velikom broju jedinki *M. avidus* kompleksa iz različitih izvora, neophodnih za kreiranje odgovarajućih

kompjuterskih modela. Zahvaljujem joj se i na korisnim sugestijama tokom izrade samog rada, koje su znatno poboljšale njegov kvalitet.

Koleginicama iz Laboratorije za genetiku, dr Nataši Kočiš Tubić, dr Ljiljani Šašić-Zorić i Maji Oberman, hvala za otvorenost, kolegijalnost i spremnost na pomoć, tokom lepog perioda zajedničkog rada. Maji Oberman veliko hvala za pomoć u laboratorijskim metodama. Srdačno se zahvaljujem dr Nataši Kočiš Tubić za korisne savete tokom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se timu prof. dr Antea Vujića na prikupljenom svežem insekatskom materijalu.

Hvala mom suprugu Vuku, na ogromnoj zasluzi u analizama izvršenim uz pomoć veštačke inteligencije. Njegov doprinos u razvoju same ideje determinacije vrste, kao i u programiranju prezentovanog modela, bio je od neopisivog značaja za uspešno privođenje kraju rada na ovoj tezi. Hvala na ljubavi i strpljenju, hvala za životnu potporu bez koje bi mnogi od naših zajedničkih ciljeva ostali neostvareni.

Hvala i svim ostalim članovima moje porodice za vrednosti kojima su me učili, za sigurnost koju su mi pružili, za podsticaj za bavljenje naukom uopše i na podršci da završim ovu disertaciju.

Dunja Popović

Berlin, 2019.

SADRŽAJ

1.UVOD	- 1 -
2.PREGLED LITERATURE	- 4 -
2.1 Molekularni i biohemijski markeri	- 4 -
2.1.1 Mitohondrijalna DNK kao molekularni marker	- 4 -
2.1.2 Alozimi kao molekularni markeri	- 6 -
2.2 Opšte karakteristike familije Syrphidae	- 7 -
2.2.1 Opšte karakteristike roda <i>Merodon</i> Meigen, 1803	- 8 -
2.2.2 Taksonomski status, biologija i distribucija vrsta u okviru <i>Merodon avidus</i> kompleksa	- 9 -
2.2.3 Pregled dosadašnjih istraživanja <i>Merodon avidus</i> kompleksa	- 11 -
2.3 Vršenje predikcije <i>Machine learning</i> tehnikama	- 17 -
2.3.1 Modelovanje distribucije vrsta	- 18 -
2.3.1.1 Osnove i biološka primena modelovanja distribucije	- 18 -
2.3.1.2 Modelovanje distribucije vrste u kontekstu specijacije	- 22 -
2.3.1.3 Modelovanje distribucije u okviru roda <i>Merodon</i> (Diptera: Syrphidae)	- 23 -
2.3.2 Veštačke neuronske mreže i njihova primena u biologiji	- 26 -
2.3.3 Primena regresionih stabala u ekološkom modelovanju	- 29 -
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	- 32 -
4. RADNA HIPOTEZA	- 33 -
5. MATERIJAL I METODE	- 34 -
5.1 Materijal	- 34 -
5.2 Metode	- 38 -
5.2.1 Izolacija DNK	- 38 -
5.2.2 Umnožavanje citohrom c-oksidaža (COI) gena DNK	- 39 -
5.2.3 Analiza sekvenci citohrom c-oksidaža I gena DNK	- 40 -
5.2.4 Analiza varijabilnosti enzimskih lokusa	- 42 -
5.2.5 Modelovanje sadašnje distribucije u okviru <i>Merodon avidus</i> kompleksa	- 46 -
5.2.6 Određivanje taksonomske pripadnosti jedinki pomoću tehinka neuronskih mreža i bustinga regresionih stabala	- 52 -
6. REZULTATI	- 54 -
6.1 Analiza DNK sekvenci mitohondrijalnog COI gena	- 56 -

6.1.1 Analiza 3' regiona COI gena	- 56 -
6.1.2 Analiza 5' regiona COI gena	- 68 -
6.1.3 Analiza ukupnih sekvenci COI gena	- 78 -
6.2 Analiza alozimske varijabilnosti	- 87 -
6.2.1 Morfološke karakteristike taksona <i>Merodon avidus</i> i <i>Merodon moenium</i>	- 87 -
6.2.2 Varijabilnost enzimskih lokusa i struktura analiziranih populacija	- 89 -
6.3 Projektovanje i komparacija ekoloških niša taksona	- 96 -
6.4. Određivanje taksonomske pripadnosti jedinki ML tehnikama	- 104 -
6.4.1 Određivanje taksonomske pripadnosti jedinki uz pomoć neuronskih mreža	- 104 -
6.4.2 Određivanje taksonomske pripadnosti jedinki GBM tehnikom reg. stabala	- 106 -
7. DISKUSIJA	- 107 -
8. ZAKLJUČAK	- 123 -
9. LITERATURA	- 125 -
10. PRILOG	- 174 -
BIOGRAFIJA	

PREGLED TABELA:

Tabela 1. Pregled uzorkovanja jedinki po populacijama za analizu alozimske varijabilnosti.....	- 37 -
Tabela 2. Enzimi, telesni regioni i puferski sistemi korišćeni u analizi	- 46 -
Tabela 3. Klimatske varijable korišćene u modelovanju distribucije vrsta <i>Merodon avidus</i> kompleksa	- 50 -
Tabela 4. Haplotipovi 3'COI regiona mtDNK i njihova zastupljenost u okviru <i>M. avidus</i> kompleksa	- 57 -
Tabela 5. Rezultati analize molekularne varijanse (AMOVA) za 3'COI sekvence za 5 populacija u okviru <i>Merodon avidus</i> kompleksa: <i>M. aff. moenium</i> , <i>M. megavidus</i> , <i>M. ibericus</i> , <i>M. moenium</i> , <i>M. avidus</i>	- 67 -
Tabela 6. Parne Φ_{st} vrednosti između <i>M. aff. moenium</i> , <i>M. megavidus</i> , <i>M. ibericus</i> , <i>M. moenium</i> i <i>M. avidus</i> bazirane na 3'COI sekvencama.....	- 68 -
Tabela 7. Haplotipovi 5'COI regiona mtDNK i njihova zastupljenost u okviru <i>M. avidus</i> kompleksa	- 68 -
Tabela 8. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) za 5'COI sekvence za 4 populacije u okviru <i>Merodon avidus</i> kompleksa: <i>M. aff. moenium</i> , <i>M. ibericus</i> , <i>M. moenium</i> , <i>M. avidus</i>	- 77 -
Tabela 9. Parne Φ_{st} vrednosti između <i>M. aff. moenium</i> , <i>M. ibericus</i> , <i>M. moenium</i> i <i>M. avidus</i> bazirane na 5'COI barkod sekvencama.....	- 77 -
Tabela 10. Haplotipovi ukupno analiziranog COI gena mtDNK i njihova zastupljenost u okviru <i>M. avidus</i> kompleksa	- 78 -
Tabela 11. AMOVA ukupnih COI sekvenci za 4 populacije u okviru <i>Merodon avidus</i> kompleksa: <i>M. aff. moenium</i> , <i>M. ibericus</i> , <i>M. moenium</i> , <i>M. avidus</i>	- 86 -
Tabela 12. Parne Φ_{st} vrednosti između <i>M. aff. moenium</i> , <i>M. ibericus</i> , <i>M. moenium</i> i <i>M. avidus</i> bazirane na ukupnim barkod sekvencama	- 86 -
Tabela 13. Frekvencije alela po lokusima i prosečan broj alela po lokusu u pojedinačnim populacijama <i>M. avidus</i> kompleksa	- 91 -
Tabela 14. Rezultati F statistike za populacije <i>M. avidus</i> i <i>M. moenium</i> . Istaknute vrednosti ukazuju na značaj lokalnog inbridinga u pojedinim lokusima, kao i na prosečnu F_{st} vrednost za sve lokuse.	- 92 -
Tabela 15 . Frekvencije alela i vrednosti heterozigotnosti po lokusima, u populacijama <i>M. avidus</i> i <i>M. moenium</i>	- 94 -
Tabela 16. Relativan doprinos varijabli u kreiranju Maxent modela. Istaknute su varijable sa najvećim relativnim kvantitativnim doprinosom za svaku od vrsta	- 102 -
Tabela 17. Komparacije ekoloških niša vrsta <i>M. avidus</i> kompleksa. Prikazane vrednosti preklapanje niša (D) korišćene su u testovima identičnosti i sličnosti vrsta A i B.....	- 103 -

PRILOG:

Tabela 1. Lista jedinki uključenih u analizu 3'COI regiona mtDNK i odgovarajući haplotipovi.....	- 148 -
Tabela 2. Lista jedinki uključenih u analizu 5'COI regiona mtDNK i odgovarajući haplotipovi.....	- 154 -
Tabela 3. Lista jedinki uključenih u analizu ukupnog COI gena mtDNK i odgovarajući haplotipovi.....	- 159 -
Tabela 4. Lista uzoraka korišćenih u analizi alozimske varijabilnosti.....	- 162 -
Tabela 5. Lista uzoraka korišćenih za modelovanje distribucije vrsta <i>M. avidus</i> kompleksa.....	- 167 -

PREGLED SLIKA:

Slika 1. Standardni koraci MLe tehnika u kreiranju i validaciji jednog prediktivnog modela	- 17 -
Slika 2. Ilustrovani prikaz veze između teorijske distribucije vrsta u geografskom i ekološkom prostoru.	- 20 -
Slika 3. Šematska ilustracija BPN mreže, sačinjene od većeg broja slojeva (lejera)	- 27 -
Slika 4. Abdomen, mužjak, dorzalna strana: A- <i>Merodon avidus</i> (jesen), B- <i>Merodon avidus</i> (proleće), C- <i>Merodon moenium</i>	- 35 -
Slika 5. Grafički prikaz lokaliteta uzorkovanja populacija korišćenih u genetičkim analizama alozima.	- 36 -
Slika 6. Mapa distribucije taksona <i>M. avidus</i> (a), <i>M. moenium</i> (b), <i>M. ibericus</i> (c) i <i>M. megavidus</i> (d)	- 48 -
Slika 7. NJ dendrogram (A) i ML stablo (B) bazirani na 3' COI fragmentu mtDNK....	- 48 -
Slika 8. Konsenzus stablo dobijeno metodom maksimalne parasimonije na osnovu sekvenci 3' regiona COI gena mtDNK.	- 65 -
Slika 9. Bajesovo filogenetičko stablo konstruisano na osnovu 87 haplotipova 3'regiona COI gena mtDNK.....	-66-
Slika 10. NJ dendrogram (A) i ML stablo (B) bazirani na 5' fragmentu COI mtDNK sekvenci <i>M. avidus</i> kompleksa.	- 73 -

Slika 11. Konsenzus stablo dobijeno metodom maksimalne parsimonije na osnovu sekvenci 5' regiona COI gena mtDNK.	75
Slika 12. Bajesovo filogenetičko stablo konstruisano na osnovu 83 haplotipa 5'COI mtDNK.	- 76 -
Slika 13. NJ dendrogram (A) i ML stablo (B) dobijeni na osnovu ukupnih COI mtDNK sekvenci <i>M. avidus</i> kompleksa	- 82 -
Slika 14. Konsenzus stablo dobijeno metodom maksimalne parsimonije na osnovu sekvenci ukupnog COI regiona mtDNK	- 84 -
Slika 15. Bajesovo filogenetičko stablo konstruisano na osnovu 90 haplotipova ukupne COI mtDNK.	- 85 -
Slika 16. Noga mužjaka, lateralna strana: a- <i>M. avidus</i> (jesenja generacija), b- <i>M. avidus</i> (prolećna generacija), c- <i>M. moenium</i>	- 88 -
Slika 17. Dijagnostički enzimski lokusi za razdvajanje taksona <i>M. avidus</i> i <i>M. moenium</i> . A-AAT lokus; B-IDH lokus.	- 90 -
Slika 18. Dendrogram populacija <i>M. avidus</i> kompleksa, baziran na genetičkoj udaljenosti po Nei-u (1978). UPGMA metod, modifikovan Neighbour-joining procedurom u okviru programa PHYLIP (verzija 3.5).	- 95 -
Slika 19. Mantelov test korelacije između F_{st} (Weir i Cockerham, 1984) genetičke udaljenosti i geografske udaljenosti (km).....	- 96 -
Slika 20. ROC grafik za takson <i>M. avidus</i> i AUC vrednosti dobijene na osnovu trening i test podataka u Maxent -u	-97-
Slika 21. Projekcija ekoloških niša Maxent-a za: a- <i>M. avidus</i> , b- <i>M. moenium</i> , c- <i>M. megavidus</i> , d- <i>M. ibericus</i>	- 100 -
Slika 22. Grafički prikaz važnosti pojedinačnih varijabli u Maxent analizi vrste <i>M. avidus</i> , dobijen jackknife testom.....	- 102 -
Slika 23. Grafički prikaz razdvajanja jedinki <i>M. avidus</i> i <i>M. moenium</i> , kao rezultat modelovanja taksonomske pripadnosti jedinki u skraćenoj bazi, upotrebom neuronske mreže, na osnovu geografskih koordinata uzoraka	- 105 -

PRILOG:

- Slika 1. Abdomen ženke, dorzalna perspektiva: A-*M. avidus*, B-*M. moenium*..... - 147 -
- Slika 2. Abdomen mužjaka, lateralna strana: A-*M. avidus*, B-*M. moenium*. - 147 -
- Slika 3. Noga ženke, lateralna strana: A-*M. avidus* (jesenja generacija), B-*M. avidus* (prolećna generacija), C-*M. moenium* - 148 -
- Slika 4. ROC grafik za taksone *M. moenium* (a), *M. ibericus* (b) i *M. megavidus* (c) i AUC vrednosti dobijene na osnovu trening i test podataka u Maxent-u. - 169 -
- Slika 5. Grafički prikaz važnosti pojedinačnih varijabli u Maxent analizi vrste *M. moenium* (a), *M. megavidus* (b) i *M. ibericus* (c), dobijen jackknife testom - 171 -
- Slika 6. Deo koda korišćenog u programiranju modela za određivanje taksonomske pripadnosti jedinki uz pomoć neuronske mreže - 173 -
- Slika 7. Deo koda korišćenog u programiranju modela za određivanje taksonomske pripadnosti jedinki GBM metodom regresionih stabala..... - 174 -

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

COI - citohrom c-oksidaža I

CytB - citohrom b-oksidaža gen

SDM - species distribution modelling (modelovanje distribucije vrsta)

PCA - principal component analysis (analiza glavnih komponenta)

MLe - machine learning

ANN - artificial neural network (veštačka neuronska mreža)

BPN - backpropagation network

GBM - gradient boosting machine learning

BRT - boosted regression trees

ML - Maximum likelihood

NJ - Neighbour-joining

MP - Maximum Parsimony

AMOVA - analysis of molecular variance (analiza molekularne varijanse)

1. UVOD

Porast uništavanja i narušavanja prirodnih ekosistema dovode do katastrofalnih posledica po biljne i životinjske vrste (Brook i sar., 2006). Stoga je danas, uz činjenicu da većina vrsta na planeti još uvek nije opisana, rad na definisanju i objašnjavanju biodiverziteta od prioritetnog značaja (Bickford i sar., 2007).

Više od polovine ukupnog broja identifikovanih živih organizama na planeti pripada insektima. Sa više od milion opisanih vrsta, pripadnici klase Insecta predstavljaju i najraznovrsniju grupu životinja (Chapman, 2006; Wilson, 2009). Stvaran broj vrsta procenjuje se na između šest i deset miliona, čime bi insekti činili 90% višecelijskih životnih formi na planeti (Erwin, 1997; Chapman, 2006).

Osnovana pretpostavka da je stvaran broj bioloških vrsta veći od trenutno definisanog, zasniva se na činjenici da specijacija nije uvek praćena promenom u morfologiji, koja je oduvek bila osnova za definiciju najvećeg broja vrsta. Istraživanja morfološki identičnih (kriptičnih) vrsta predstavljala su izazov za biologe još u periodu pre usvajanja Lineovog sistema klasifikacije (Mayden, 1997). Rad na kriptičnim vrstama doživeo je ekspanziju u poslednjih nekoliko dekada, pre svega usled porasta u broju dostupnih molekularnih alata, prvenstveno sekvenciranje DNK (Bickford i sar., 2007).

U literaturi se sreću različiti pojmovi i definicije kriptičnih vrsta. Mnogi autori pojam „kriptične“ označavaju sinonimnom sa „srodnim vrstama“ (Saez i Lozano, 2005), dok drugi naglašavaju da termin „srodne“ ukazuje na skorije odigranu specijaciju u odnosu na „kriptične“ i „sestrinske vrste“ (Knowlton, 1986). U svakom slučaju, opšte je prihvaćena definicija da su kriptične vrste one koje su klasifikovane, ili su do nekog momenta bile klasifikovane, kao jedna nominalna vrsta, usled toga što se pri osnovnom pregledu morfologije ne mogu morfološki razdvojiti (Bickford i sar., 2007). Neki autori dodaju da se vrste mogu označiti kao „kriptične“ tek ukoliko, uz gore navedeno, za njih važi: da su se skoro razdvojile, da se mogu detektovati samo uz pomoć molekularnih podataka, da se pojavljuju u simpatriji i da su reproduktivno izolovane (Stebbins, 1950). Novija istraživanja osporila su ovu premisu i pokazala primere postojanja kriptičnih vrsta čija se diferencijacija odigrala u davnim trenucima evolucione istorije (Colborn i sar., 2001; Rocha-Olivares i sar., 2001; Lefébure i sar., 2006).

Visoka uspešnost u otkrivanju kriptičnih vrsta upotrebom samo genetičkih markera, ili u kombinaciji sa morfološkim i ekološkim podacima, sugeriraju na neophodnost rutinske upotrebe molekularnih informacija od strane taksonoma (Bickford i sar., 2007). Velike genetičke udaljenosti između jasno definisanih vrsta, često u kombinaciji sa morfološkim, geografskim, ili nekim dodatnim karakteristikama, dovele su do otkrivanja kriptičnih vrsta kod većine tipova organizama i staništa, od rakova u dubokim morima (Vrijenhoek i sar., 1994) i riba iz tekućih voda (Feulner i sar., 2006), do tropskih vrsta leptira (Hebert i sar., 2004), arktičkih vrsta biljaka (Grundt i sar., 2006) i osolikih muva (Vujić i sar. 2013a; Popović i sar., 2015; Ačanski i sar., 2016a; Šašić i sar., 2016; 2018, Kočiš Tubić i sar., 2018; Radenković i sar., 2018a,b)

Integrativna taksonomija podrazumeva uporedno korišćenje nezavisnih tipova podataka (npr. molekula, morfologije, hemijske signalizacije) u cilju dobijanja jasnog dokaza za razdvajanje vrsta (Mayr, 1963). Morfološke promene ne samo da ne moraju biti sinhronizovane sa granicama između vrsta, već postoje podaci o prisustvu selekcije koja, u slučaju kriptičnih vrsta, promovira morfološku stagnaciju, te redukuje ili eliminiše morfološke promene u procesu specijacije (Schröngge i sar., 2002). Tako bi vrste koje, u ekstremnim ekološkim uslovima, sa ciljem adaptacije na specifičnog domaćina, prolaze kroz snažnu selekciju u fiziologiji i ponašanju, istovremeno mogle biti izložene i stabilizacionoj selekciji na nivou morfologije (Schröngge i sar., 2002). Čini se da su organizmi čija reproduktivna komunikacija nije prevashodno vizuelna (komunikacija zvukom, vibracijama, feromonima ili električnim signalima) najveći izvor prisutva kriptičnih vrsta, jer promena u navedenim signalizacijama ne mora podrazumevati i morfološku (Bickford i sar., 2007). Neki od najbolje proučenih primera kriptične specijacije odnose se na insekte (Henry, 1994), žabe (Gerhardt, 2005; Stuart i sar., 2006), ribe (Feulner i sar., 2006) i osolike muve (Marcos-García i sar., 2007, 2011; Ståhls i sar., 2009; Vujić i sar. 2013, 2019; Radenković i sar., 2011, 2018). Bickford i sar. (2007) ističu da je, s obzirom na velik broj tipova specijacije, kao i na kompleksnost njihovih mehanizama, teško sprovesti jednostavno povezivanje pojma „kriptične specijacije“ sa određenim evolucionim mehanizmom. Ukazano je, međutim, da bi veliki broj istraživanja o kriptičnim vrstama mogao pružiti sliku o tome koja se obeležja i koji procesi najčešće javljaju u procesu njihove diferencijacije.

Značaj identifikacije vrsta u kriptičnim kompleksima ogleda se u više aspekata: od konzervacionog planiranja i bioloških kontrola, do potencijalne primene u tretmanima

određenih bolesti (Besansky i sar., 1999). Mogućnost identifikacije kriptičnih vrsta otvara vrata ka njihovom proučavanju, konzervaciji i pozitivnom iskorišćavanju i predstavlja važan korak u zaštiti i menadžmentu prirodnih resursa (Bickford i sar., 2007, Milić i sar., 2019). Dobar primer je slučaj obične plave školjke *Mytilus edulis*, važne indikatorske vrste, sa primenom u praćenju zagađenja, u kome je otkriveno je da je u pitanju kompleks vrsta koji se sastoji od tri različite kriptične vrste. S obzirom na to da se svaka od ovih vrsta razlikuje u odgovoru na uslove sredine, autor je ukazao na to da će primena pojedinačnih vrsta kao bioindikatora zagađenja, kontaminacije teških metala i narušavanja ekosistema, dovesti do tačnijih merenja u odnosu na ona koja se oslanjaju na čitav kompleks (Geller, 1999).

U konzervacionom planiranju, kriptične vrste zahtevaju specijalno razmatranje jer: 1) vrste koje se već smatraju ugroženim, mogu se sastojati od većeg broja, još ugroženijih vrsta i 2) različite vrste, po pravilu, mogu zahtevati različite konzervacione strategije (Schönrogge i sar., 2002). Tako je u istraživanju baziranom na varijabilnosti DNK sekvenci jedne grupe žaba, molekularnim podacima otkriveno minimum 14 vrsta, u okviru dve nominalne vrste (Stuart i sar., 2006). Dok su kriptični kompleksi imali široku geografsku distribuciju, okviri stvarnih vrsta pokazali su se znatno ograničenijim, stavljajući novootkrivene vrste u ugroženiju kategoriju. Verovatno najveći izazov u konzervaciji globalnog biodiverziteta je prevencija gubitka staništa, a postavljanje prioriteta zaštite staništa često se oslanja na procenu biodiverziteta i endemizama. Stoga bi otkriće geografsko-ekoloških obrazaca u distribuciji kriptičnih vrsta moglo dovesti do rasvetljavanja onih aspekata diverziteta, koji bi vodili razmatranju konzervacije određenih staništa (Bickford i sar., 2007). Wiens i Graham (2005) sugerisali su da je kombinovanje informacija o geografskoj distribuciji sa genetičkim informacijama različitih lokusa najbolji put ka dijagnostifikovanju vrsta i dobijanju daljih informacija od potencijalnog značaja za primenu u zaštiti ekosistema.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 Molekularni i biohemijski markeri

2.1.1 Mitohondrijalna DNK kao molekularni marker

U protekloj dekadi došlo je do velikog napretka u upotrebi sve bržih i tehnološki naprednijih tehnika sekvenciranja nukleinskih kiselina u rešavanju problema filogenetičkih studija. Dostupnost sve veće količine podataka o sekvencama inicirala je i razvoj odgovarajućih alata za matematičku i statističku analizu, kako bi se navedeni podaci mogli tumačiti i primenjivati u kontekstu evolucije i molekularne sistematike (Patwardhan i sar., 2014).

Mitohondrijalna DNK je cirkularni dvolančani DNK molekul, koga karakterišu odsustvo rekombinacija i uniparentalno nasleđivanje, usled čega se bilo koji blok lokusa mitohondrijalnog genoma posmatra kao jedan haplotip. Haploidnost i uniparentalno nasleđivanje mitohondrijalnog genoma pretvorilo ga je u genetički marker od izuzetnog značaja za populacionu genetiku i evoluciju. Stoga je upotreba mtDNK postala učestala u filogenetičkim i populaciono-genetičkim studijama, a podaci o njenim sekvencama pokazali su se kao izuzetan alat u rešavanju filogenetičkih pitanja na nivou vrste (Patwardhan, 2014), kao i u rešavanju taksonomskih problema (Wan i sar., 2004). Za definisanje vremena razdvajanja posmatranih populacija ili taksona, koristi se „teorija molekularnog sata”, čiju su hipotezu predložili Zuckerkandl i Pauling (1965). Oni su, proučavajući sekvence amino-kiselina iz hemoglobina različitih vrsta, došli do zaključka da, tokom vremena, postoji konstantna stopa substitucija amino kiselina i sugerisali da su razlike u amino kiselinama u korelaciji sa evolutivnom vremenskom skalom. Teoriju molekularnog sata bazirali su na konstantnoj stopi promena u DNK sekvenci tokom vremena, kao osnovu za procenu vremena divergencije različitih linija u okviru filogenetskog stabla (Zuckerkandl i Pauling, 1965). Ova teorija danas omogućava da se na osnovu genetičke varijabilnosti vrsta proceni njihovo geografsko rasprostranjene i centri

rasprostranjenosti (Rocha i sar., 2008), što može dovesti do otkrivanja istorijske i trenutne barijere u protoku gena između njih (Awise, 2000).

Regioni mitohondrijalnog genoma od najčešćeg interesa u istraživanjima prirodnih populacija su: kontrolni region, 12S/16S rRNK, CytB (citohrom b-oksidaža gen) i citohrom c-oksidaža I gen (COI). Kontrolni region predstavlja nekodirajući segment mtDNK uključen u regulaciju i inicijaciju njene replikacije i transkripcije. Karakterišu ga tačkaste mutacije, sa snažnom preferencijom ka tranzicijama u odnosu na transverzije (Brown i sar., 1982). 12S rRNK predstavlja gen za odgovarajuću rRNK prisutnu u mitohondrijalnim ribozomima i do sada je najuspešnije korišćen u detekciji vrsta koje karakteriše relativno dug period razdvajanja (Patwardhan, 2014). Citohrom b-oksidaža gen pronalazi široku primenu u otkrivanju filogenetičkih veza između blisko vezanih taksona na različitim taksonomskim nivoima, pri čemu je primećeno slabljenje rezolucije ovog markera na evololativno dublje pozicioniranim čvorovima (Bradley i sar., 2007).

Citohrom c-oksidaža je jedan od proteina elektron-transportnog lanca, čija je funkcija da, kao poslednji enzim u lancu, redukuje kiseonik i pumpa protone kroz unutrašnju mitohondrijalnu membranu. COI gen karakteriše spora evolucija u poređenju sa drugim protein-kodirajućim mitohondrijalnim genima, pa navedeni marker nalazi široku primenu u proceni molekularne filogenije (Russo i sar., 1996). Uzimajući u obzir retke insercije i delecije u mitohondrijalnim genima, dostupnost univerzalnih prajmera za amplifikaciju i visoku stopu nukleotidnih suspsitucija, 658 baznih parova dug fragment na 5' kraju gena subjedinice I mitohondrijalne citohrom c-oksidaže (COI) predložen je kao univerzalni marker („DNK barkod“) za identifikaciju vrsta u okviru životinjskog carstva (Hebert i sar., 2003a, b). Filogenetičke analize u okviru *Merodon avidus* kompleksa potvrdila su uspešnu primenjivost i drugog kraja (3' COI) istoga gena u identifikaciji jedne od vrsta (Milankov i sar., 2009). Njegove sekvence primenjuju se u rešavanju filogenetičkih problema insekata, na različitim hijerarhijskim nivoima, od blisko vezanih vrsta, do subfamilija i familija, pa i redova (Patwardhan i sar., 2014). S obzirom na njegovu funkciju, promene u aminokiselinskoj sekvenci citohrom c-oksidaže, koje rezultuju u modifikaciji proteinske strukture ovog enzima, mogu se odraziti na energetski metabolizam (Pentisaari i sar., 2016). Kako protein-kodirajući geni, generalno, stoje pod velikim uticajem negativne prirodne selekcije, substitucije amino-kiselina su retke, naročito kod citohrom-oksidaža gena (Castoe i sar., 2008). Na nivou mtDNK sekvenci utvrđeno je prisustvo negativne (Pessole i sar., 1999; Galtier, 2009), ali i pozitivne prirodne selekcije (Da Fonseca i sar.,

2008; James i sar., 2015). Obrazac DNK varijabilnosti u regionu barkoda mogući je odraz ukupnog delovanja selekcije na proteinskom nivou. Stoga je za očekivati da bi kombinovana upotreba informacija o DNK i proteinskoj varijabilnosti bila efikasna u identifikaciji i delineaciji vrsta, kao i u sticanju funkcionalnog uvida u raznovrsne i obimne izvore podataka (Pentisaari i sar., 2016). Broj COI barkod sekvenci, čuvanih i dostupnih u okviru javne baze podataka (Barcode of Life Datasystems database-BOLD, <http://www.boldsystems.org/>), u neprekidnom je porastu i iznosio je, prema poslednjim podacima, 4,7 miliona (Pentisaari i sar., 2016). Broj ovih sekvenci u NCBI banci (www.ncbi.nlm.nih.gov) danas iznosi oko 2,5 miliona (Porter, 2018).

2.1.2 Alozimi kao molekularni markeri

Alozimi, različite forme enzima kodirane alelima istog enzimskog lokusa, predstavljaju genetičke markere koji se mogu koristiti za rešavanje filogenetičkih pitanja. Metoda enzimske elektroforeze pokazala se, počev od 60-ih godina XX veka, korisna u proučavanju genetičke varijabilnosti prirodnih populacija (Lewontin i Hubby, 1966; Johnson i sar., 1966; Harris, 1969; Selander i Yang, 1969). Ona omogućava sagledavanje izozimske/izoenzimske (molekulske forme enzima kodirane alelima različitičkih lokusa) (Hunter i Market, 1957) i alozimske/aloenzimske (molekulske forme enzima kodirane alelima istog lokusa) (Prakash i sar., 1969) varijabilnosti. Preko zimograma (elektroforetske slike enzima), koji je rezultat kretanja proteinskih molekula na određenom nosaču (5% poliakrilamid gel) u tečnom medijumu (pufer određene pH vrednosti i jonske snage), detektuju se razlike između proteina kodiranih alelima različitih gena (Hunter i Market, 1957). Na mobilnost polipeptidnih lanaca, pored jačine električnog polja, pufera i nosača, utiču i osobine samih molekula, kao što su naelektrisanje, veličina i oblik. Detektovane razlike u mobilnosti proteinskih subjedinića su u najvećoj meri genetički deteminisane, jer primarna struktura proteina određuje neto naelektrisanje i utiče na formiranje sekundarne, tercijarne i kvaternarne strukture proteina (Milankov, 2000).

Dijagnostički lokusi enzima i fiksirane razlike u frekvenciji njihovih alela mogu se koristiti u cilju identifikacije genetičke izolacije vrsta. Alozimi kao dijagnostički karakteri istovremeno su i indikatori prisustva bliskih, morfološki (skoro) identičnih vrsta i/ili vrsta sa preklapajućom ekološkom distribucijom. Kao takvi, prvi put su upotrebljeni za

razlikovanje 12 sestrijskih vrsta *Drosophila willinstonii* grupe (Ayala i sar., 1972). U ovoj obimnoj studiji, koja je obuhvatila 28 enzimskih lokusa i 12 blisko vezanih vrsta, autori su, pored merenja genetičke diferencijacije u okviru i između vrsta, pokušali da objasne i evolutivne mehanizme koji su do njih doveli. Polazeći od teorije adaptivno neutralnih mutacija i "nasumične evolucije" (Dobzhansky, 1970), uz pomoć jednačine za efektivan broj neutralnih alela (na osnovu stope mutacije istih i efektivne veličine populacije (Kimura i Crow, 1964)), Ayala i sar. (1972) su zaključili da većina enzimske varijabilnosti, detektovane kod *D. willinstonii* grupe, nije adaptivno neutralna. Uočena je i sličnost u obrascu frekvencije alela, čak i kod populacija koje su geografski izolovane od ostalih. Stoga je postavljena hipoteza da je balansna selekcija ključan faktor u kontroli genetičke varijabilnosti prirodnih populacija (Ayala i sar., 1971).

Analiza alozimske varijabilnosti i dalje predstavlja standardnu metodu za rešavanje različitih bioloških problema. Alozimi se koriste kao genetički markeri u sistematici i imaju primenu u genetičkoj identifikaciji, analizi populacija, determinaciji genetičkog fonda vrste (simpatričkih, alopatričkih vrsta, hibridnih zona, partenogenetskih klonova), kao i evolucionih odnosa i filogenije svih grupa organizama (Milankov, 2000; Desvignes i sar., 2001; Vázquez-Prieto i sar., 2011).

2.2 Opšte karakteristike familije Syrphidae

Osolike muve pripadaju klasi insekata (Insecta), redu Diptera i podredu Cyclorrhapha. Predstavljaju vrstama brojnu familiju insekata, sa oko 6.000 opisanih vrsta svrstanih u 188 rodova, od čega je približno 1.800 vrsta iz 107 rodova zastupljeno u Palearktiku (Thompson i Rotheray, 1998). Na osnovu morfoloških karakteristika odraslih jedinki, familija Syrphidae se deli na tri podfamilije: Eristalinae (sa tribusima Cheliosiini, Callicerini, Volucellini, Chrysogasterini, Sericomyni, Eumerini, Psarini, Ceriodini, Eristalini, Miledsiini, Xylotini i Pipizini), Syrphinae (Syphini, Bacchini, Chrysotoxini, Melanostomatini, Paragini) i Microdontinae (Peck, 1988).

Vrste ove familije javljaju se skoro svuda i u najrazličitijim staništima, a jedino odsustvuju na Antarktiku i na okeanskim ostrvima. Ovako široka rasprostranjenost omogućena je visokim stepenom adaptivne radijacije, kao i različitim tipovima larvalnog

razvića i ekoloških zahteva adulata (Thompson, 1999). Najčešći tipovi ekosistema koje osolike muve naseljavaju su šume, močvare, tresetišta i vlažne livade (van Veen, 2004). Najbrojniji rodovi na području Palearktika su *Merodon* Meigen, 1803; *Cheliosia* Meigen, 1822 i *Eumerus* Meigen, 1822 (Hurkmans, 1993).

2.2.1 Opšte karakteristike roda *Merodon* Meigen, 1803

Rod *Merodon* pripada Familiji Syrphidae, podfamiliji Eristalinae i tribusu Eumerini. Pored roda *Merodon*, ovom tribusu pripadaju i vrste rodova *Eumerus* Meigen, 1822; *Platynochaetus* Wiedemann, 1830 i *Psilota* Meigen, 1822 (Peck, 1988). Najobimniju reviziju evropske faune roda *Merodon* napravio je Hurkmans (1993) u prvom delu monografije, koja sadrži opise i ključ za determinaciju 61 vrste, definisanih u 11 monofiletskih grupa (*alagoezicus*, *alexaji*, *avidus*, *clavipes*, *crassifemoris*, *elegans*, *longicornis*, *nigritarsis*, *pruni*, *tarsatus* i *vandergooti*). S obzirom na to da njegov rad nije nikada završen, čak i ova revizija smatra se delimičnom (Speight, 2017). Marcos Garcia i sar. (2007) predstavili su ključ za 34 nove vrste roda *Merodon* sa Iberijskog poluostrva, kao i za alžirsku vrstu *M. hurkmansi* sp. nova. Naredni period obuhvatio je niz različitih istraživanja na određenim grupama vrsta, uključujući grupe *aureus*, *nanus*, *nigritarsis* i *ruficornis* (Milankov i sar., 2008; Francuski i sar., 2009, 2011; Ståhls i sar., 2009; Vujić i sar., 2012, 2013, 2015; Šašić i sar., 2016; Ačanski i sar., 2016b). Sa područja Evrope, rod *Merodon* je najintenzivnije je proučavan na Balkanskom poluostrvu, Iberijskom poluostrvu, Egejskim ostrvima i u Turskoj (Ståhls i sar., 2009; Marcos-García i sar., 2011; Petanidou i sar., 2011; Radenković i sar., 2011; Ricarte i sar., 2012; Ståhls i sar., 2016; Vujić i sar., 2007, 2011).

Adultne jedinke *Merodona* su srednje do krupne osolike muve (7-23mm), većinom tamne osnovne boje, sa crvenkastim ili bledim šarama na abdomenu i odsutnim dlakama na abdomenu i toraksu (Ståhls i sar., 2009). Za vrste roda *Merodon* karakteristična je izražena Bejtsova mimikrija (veličina, dlakavost, boja), kao i način larvalnog razvića. Stanovište da se larve razvijaju u rizomima i lukovicama raznih vrsta familija Iridaceae i Amaryllidaceae (Hurkmans, 1993), prošireno je nedavnim pronalaženjem larvi vrste *Merodon avidus* (Rossi, 1790) u lukovicama vrste *Ornithogalum umbellaum* L., iz familije Hyacinthaceae

(Andrić i sar., 2014), kao i novim opisima larvi roda *Merodon* (Ricarte i sar., 2017; Preradović i sar., 2018). Larve roda *Merodon* su fitofagi i mogu da nanesu štetu ukrasnim i gajenim biljkama (Andrić i sar., 2014). Istovremeno, adulti su značajni oprašivači divljih i gajenih biljnih vrsta (Proctor i sar., 1996). Adulti posećuju cvetove raznih vrsta biljaka, često iz familije Apiaceae (Hurkmans, 1985). To su termofilni, kserotolerantni organizmi, koji naseljavaju suve i tople, vlažne i tople, kao i hladne i suve regione. Stoga se mogu pronaći u različitim tipovima staništa, od tropskih i subtropskih regiona do planinskih masiva preko 3000 metara nadmorske visine, ali ubedljivo najveću raznovrsnost dostižu u Mediteranu (Hurkmans, 1988, 1993). Zabeleženo je, ipak, da većina vrsta preferira suva i topla staništa, kao i da se adulti najčešće mogu videti na otvorenim staništima kako lete kroz vegetaciju ili se odmaraju na kamenju i na golom tlu (van Veen, 2004). Odrasle jedinke uglavnom lete u periodu od maja do avgusta meseca (Vujić, usmeno). Zapažena je pojava teritorijalnosti mužjaka pojedinih vrsta, u zavisnosti od raspoloživog prostora, prisustva ženki, veličine populacije i vremenskih uslova (Hurkmans, 1988).

Do nedavno smatran za drugi po veličini, sa preko 100 evidentiranih vrsta (Speight, 2017), danas rod *Merodon* predstavlja najveći rod u okviru familije osolikih muva u Evropi (Vujić i sar., 2015). Ovom saznanju doprinelo je nekoliko studija u kojima su opisani novi taksoni (Marcos-García i sar., 2007; Popov, 2010; Ačanski i sar., 2016a; Radenković i sar., 2011, 2018a,b; Vujić i sar., 2007, 2012, 2013a, 2013b, 2015, 2018a,b, 2019; Šašić i sar., 2016, 2018; Veselić i sar., 2017; Kočiš Tubić i sar., 2018). Rod je zastupljen u Palearktiku i Etiopskom regionu, pri čemu se najviše vrsta javlja u stepama istočne Evrope i okolini, a 62 vrste zabeležene su u Turskoj (Saribiyik, 2014). Značajan broj vrsta (37 od 57 vrsta jugoistočne Evrope) ovog roda su morfološki i/ili genetički kriptične, sa distribucijom koja je ograničena na ostrva ili određene planinske okvire (Vujić i sar., 2016; Radenković i sar., 2018).

2.2.2 Taksonomski status, biologija i distribucija vrsta u okviru *Merodon avidus* kompleksa

Vrstu *M. avidus* opisao je Rossi, 1790 pod nazivom *Syrphus avidus*. Varijabilnost određenih karaktera poput obojenosti antena, nogu i abdomena, koja onemogućava pouzdanu identifikaciju pojedinih jedinki, dovela je do toga da ova vrsta bude opisana pod

24 različita imena: *Syrphus avidus* Rossi, 1790; *Syrphus spinipes* Fabricius, 1794; *Merodon serrulatus*; *Merodon italicus* Rondani, 1845; *Merodon rufitibius* Rondani, 1845; *Merodon graecus* Walker, 1852; *Merodon aurifer*, Loew, 1862; *Merodon quadrilineatus*, Lioy, 1864; *Merodon avidus*, Rondani 1845; *Lampetia avida*, Seguy 1961; *Milesia spinipes*, Latreille 1804; *Merodon spinipes*, Fabricius 1805; *Lampetia spinipes*, Oldenberg 1919; *Merodon serrulatus*, Schiner 1857; *Lampetia serrulata*, Sack 1931; *Merodon italicus*, Rondani 1857; *Lampetia italica*, Sack 1931; *Merodon rufitibius*, Rondani 1857; *Lampetia rufitibia*, Sack 1931; *Merodon graecus*, Schiner 1857; *Merodon aurifer*, Peck 1988; *Lampetia aurifera*, Sack 1931; *Merodon quadrilineatus*, Peck 1988; *Lampetia quadrilineata*, Sack 1931. Hurkmans (1993) je izdvojio *avidus* grupu na osnovu apomorfnih karaktera abdomena i anteriornog lobusa surstila genitalnog aparata mužjaka i u nju svrstao samo jednu vrstu. On je pretpostavio da su veličina i obojenost jedinki povezani sa količinom i kvalitetom ishrane u larvalnim fazama, te mogu dovesti do visoke varijabilnosti karaktera u okviru vrste.

Milankov i sar. (2001) navode da adultni mužjaci ove grupe pokazuju teritorijalno ponašanje, obigravanjem oko granica svoje teritorije i mirovanjem na izloženim površinama. U istom radu je navedeno da se jedinke *M. avidus* mogu pronaći od marta do oktobra, pre svega na vlažnim biotopima i staništima.

Stariji naučni izvori beleže da je *M. avidus* ekstremno rasprostranjena evropska vrsta, odsutna samo u severnim područjima, čiji se primerci mogu pronaći i u severnoj Africi, na srednjem Istoku, kao i u maloj Aziji (Drickx, 1994).

Prema najnovijim taksonomskim analizama (Ståhls i sar., 2009; Popović i sar., 2015; Ačanski i sar., 2016a) *M. avidus* kompleks se sastoji od 4 vrste- *Merodon avidus* Rossi, 1790, *Merodon moenium* Wiedemann, 1822, *Merodon ibericus* Vujić, 2015 i *Merodon megavidus* Vujić i Radenković, 2016, za koje je zabeležena sledeća distribucija:

- areal vrste *Merodon avidus* obuhvata mediteranski basen (južna Francuska, Italija, obala Jadranskog mora, južna Bosna i Hercegovina, Crna Gora, Albanija, Makedonija, Grčka, Turska, Izrael i Kipar), Srbiju, istočnu Bugarsku i Krim (Slika 6a);
- vrsta *Merodon moenium* je široko rasprostranjena, od kontinentalnog dela Evrope (Francuska, Holandija, Nemačka, Poljska, Češka, Danska, Južna Švedska, Švajcarska, Slovačka, Slovenija, Rumunija i Srbija) preko pojedinih delova mediteranskog basena

(južna Francuska, Korzika, Italija sa Sicilijom, Jadranski region Hrvatske i Bosne, Crna Gora, Makedonija i Grčka) do obale Crnog mora (Bugarska) (Slika 6b);

- vrsta *Merodon ibericus* se javlja u zapadnom Mediteranu, na Iberijskom poluostrvu i u Maroku (Slika 6c);

- *Merodon megavidus* u osnovi predstavlja endem grčkog ostrva Lezbos (Slika 6d). Noviji podaci beleže prisustvo ovog taksona i na obližnjem grčkom ostrvu Samos, kao i u pokrajini Konia u centralnoj Turskoj (Vujić, usmeno).

2.2.3 Pregled dosadašnjih istraživanja *Merodon avidus* kompleksa

Analiza alozimske varijabilnosti elektroforezom, do tada već primenjivana kod drugih insekatskih grupa, implementirana je u cilju identifikacije blisko vezanih vrsta osolikih muva (Milankov i sar., 2001). Dva enzimska lokusa (Idh-2 i Aat) pokazala su se dijagnostičkim u razdvajanju kriptičnih vrsta *M. avidus* kompleksa, usled prisustva specifičnih i fiksiranih alela u navedenim lokusima. Idh-2 lokus bio je potpuno dijagnostičan, sa potpuno fiksiranim alelima, jedinstvenim za svaki od taksona (alel d kod prvog i alel g kod drugog taksona). U okviru AAT lokusa je alel e, specifičan za prvi takson, zabeležen samo u pojedinim populacijama drugog taksona (Dubošnica, Srbija i Pindos, Grčka). Morfološki karakteri (dužina 3. antenalnog segmenta, izgled tergita II, boja tibije, dužina i struktura dlaka na telu, dužina mezoskotuma, boja tergita III), korišćeni u preliminarnom razdvajanju jedinki, u kombinaciji sa dva dijagnostička enzimska lokusa, ukazali su na postojanje dva taksona u okviru sedam analiziranih populacija. Taksoni su ovom prilikom označeni kao *M. avidus* A (mediteranska vrsta) i *M. avidus* B (planinska vrsta), te je zaključeno da je široko rasprostranjena vrsta *M. avidus* u stvari geografski i genetički strukturiran takson koji obuhvata različite grupe kriptičnih taksona. Istom prilikom, uočena je intraspecifična varijabilnost između pojedinih populacija, prisutvo velikog broja polimorfnih lokusa, kao i jedinstvenih i retkih alela. Najveći broj jedinstvenih i retkih alela je detektovan u populaciji *M. avidus* A iz Morinja (Crna Gora). Populacije *M. avidus* B iz Mavrova (Makedonija) i Pindosa (Grčka) imale su po dva retka alela, dok nijedan jedinstveni alel nije zabeležen u izučavanim populacijama *M. avidus* B. U okviru F-statistike, uočen je visok nivo razlika u frekvencijama alela između analiziranih

populacija u celini ($F_{st}=0,511$), čime je učvršćena pretpostavka o prisustvu dva taksona. Novootkriveni taksoni okarakterisani su kao delimično geografski izolovani, pri čemu se *M. avidus* B jedinke nisu mogle pronaći u mediteranskim staništima, dok su mediteranske jedinke bile prisutne na par kontinentalnih lokaliteta. Utvrđeno je i postojanje simpatrije taksona *M. avidus* A i B na jednom lokalitetu (Dubašnica, Srbija) (Milankov i sar., 2001).

Dalja analiza varijabilnosti enzimskih lokusa usmerila se samo na takson *M. avidus* A, u analizi genetičke diferencijacije između tri konspecifične populacije-Dubašnica (Srbija), Morinj (Crna Gora) i Pindos (Grčka) (Milankov i sar., 2004). Genetička diferencijacija je kvantifikovana F_{st} vrednošću, koja je inverzna funkcija protoka gena između populacija. Uočeno je da se i vrednosti genetičke diferencijacije i genetičke udaljenosti, u gotovo svim analiziranim parovima populacija, povećavaju sa porastom geografske razdaljine između njih. Stoga je zaključeno da bi, pored broja migranata (protoka gena), različiti selekcionarni pritisci na različitim staništima mogli uticati na stepen genetičke diferencijacije između pojedinih konspecijskih populacija (Milankov i sar., 2004).

Mengual i sar. (2006) su analizirali COI sekvence mitohondrijalne DNK kod jedinki roda *Merodon* i pokazali da kompleks vrsta *M. avidus* u širem smislu pripada grupi *M. nigratarsis*. Identifikovane su četiri grupe unutar roda *Merodon* sa Iberijskog poluostrva, a među njima i *nigratarsis* grupa sa vrstama: *Merodon avidus* B *sensu* Milankov i sar., 2001, *Merodon elegans* Hurkmans 1993, *Merodon serrulatus* Wiedemann, 1822 i *M. nigratarsis* Becker, 1903.

Dalja istraživanja na jedinkama iz *avidus* kompleksa takođe su bila bazirana na analizi molekularne varijabilnosti COI sekvenci. Milankov i sar. (2009) su analizirali molekularnu i fenotipsku varijabilnost jedinki *M. avidus* kompleksa sa Balkanskog poluostrva, Francuske i Španije. Na osnovu morfologije, kao i na osnovu specifičnih alela prethodno utvrđenih dijagnostičkih enzimskih lokusa, jedinke su preliminarno bile označene kao vrsta *M. avidus* A, *M. avidus* B. Od ukupno 20 uočenih mtDNK haplotipova, definisanih kroz 53 varijabilne pozicije, se pokazalo jedinstveno za *M. avidus* A, šest za *M. avidus* B, tri za jedinke iz Španije (naknadno označene kao *M. bicolor*), dok su četiri haplotipa bila zajednička za taksona *M. avidus* A i *M. avidus* B. Haplotipovi su formirali dve klade, različite u više od 29 nukleotidnih promena: jednu kladu činila je vrsta *M. bicolor* iz Španije, dok su drugu činili *M. avidus* A i *M. avidus* B sa Balkanskog poluostrva i Francuske. Stoga je uočeno da, uprkos izraženoj varijabilnosti haplotipova, na osnovu

varijabilnosti mtDNA COI sekvenci nije bilo moguće uspešno razdvojiti *M. avidus* A i *M. avidus* B taksone, kao što je bio slučaj sa dijagnostičkim enzimskim lokusima. *M. bicolor* klada, sa samo dve zabeležene nukleotidne promene, odgovarala je taksonu iz Španije, koji je, na osnovu morfoloških karaktera, prvobitno bio identifikovan kao *M. avidus* B sensu (Mengual i sar., 2006; Marcos-García i sar., 2007). Zbog jasnih genetičkih razlika (COI haplotip) i parametara krila utvrđenih u datom istraživanju, ovaj takson redefinisani je pod imenom *Merodon bicolor* Gil Collado, 1930 (Milankov i sar., 2009). Kasnije će, zbog zauzetosti imena *Merodon bicolor* Walker, 1852, prema pravilima Internacionalnog kodeksa zoološke nomenklature, za ovu vrstu biti uspostavljeno novo validno ime *Merodon ibericus* Vujić, 2015 (Popović i sar., 2015). U okviru mediteranskih populacija *M. avidus* A uočena je i temporalna divergencija. S obzirom na to da su prolećni primerci, sakupljeni u aprilu, delili haplotipove sa populacijama *M. avidus* B (Durmitor, Crna Gora i Dubašnica, Srbija), pretpostavljeno je da bi prolećna generacija na ovim lokalitetima (Lezbos, Grčka i Morinj, Crna Gora) mogla pripadati *M. avidus* B taksonu, a letnja i jesenja taksonu *M. avidus* A (Milankov i sar., 2009). Istom prilikom urađene su i geometrijsko-morfometrijske analize parametara krila. Utvrđena je varijabilnost u obliku krila, ali i visok stepen sličnosti između alopatričkih metapopulacija taksona *M. avidus* A i *M. avidus* B, čime je onemogućena jasna podela *M. avidus* vrste na dva navedena taksona. Na osnovu geometrijsko-morfometrijske analize, populacija *M. avidus* A iz Makedonije i Panonske nizije se preklapala sa populacijom *M. avidus* B sa Durmiora, Stare planine i Kopaonika, dok je populacija *M. avidus* A iz Morinja bila najudaljenija od ostalih. Ovo poslednje bilo je u skladu sa rezultatima dobijenim analizom maksimalne parsimonije, uz pomoć COI markera (Milankov i sar., 2009).

Analizom 22 jedinke roda *Merodon* sa ostrva Lezbos (Grčka), Ståhls i sar. (2009) imali su za cilj upostavljanje barkoding sistema za sve vrste sa navedenog ostrva, upotrebom 5' kraja mitohondrijalnog COI gena od 650 nukleotida. Analiza parsimonije pokazala se uspešnom u identifikaciji gotovo svih poznatih taksona, a ustanovljeno je i prisustvo novog, morfološki kriptičnog taksona, *M. sp. nova 2* iz *avidus* kompleksa. Iako je detaljno proučavanje morfologije pokazalo izvesne morfološke osobenosti kod *M. sp. nova 2*, sličnost između ovog taksona i *M. avidus* A činila ih je gotovo nerazdvojivim. Na nuklearnom nivou, ovaj takson se razlikovao od analiziranih jedinki taksona *M. avidus* A u četiri jedinstvene nukleotidne promene. U okviru vrste *M. avidus* A, kod jedne od tri analizirane jedinke, uočena je prisutnost jedne jedinstvene nukleotidne promene.

Istovremeno, COI barkod pristup ponovo se pokazao nesavršenim u identifikaciji vrsta, ne uspevši da razdvoji morfološki različite vrste *M. loewi* i *M. papillus*, koje su delile jedan haplotip. Pojava zajedničkog haplotipa je objašnjena mogućim zadržavanjem ancestralnog polimorfizma, ili prisustvom mitohondrijalne introgresije između taksona. Uprkos potvrđenoj upotrebi DNK barkodinga u dobijanju taksonomskih informacija, istaknuta je važnost integrativne upotrebe karaktera iz različitih izvora, kao što su morfološki i ekološki podaci, ili molekularni podaci iz većeg broja lokusa (Ståhls i sar., 2009).

Uporedno sagledavanje upotrebe enzimskih lokusa i COI sekvence mitohondrijalne DNK u razdvajanju kriptičnih taksona *M. avidus* kompleksa predstavlja prve rezultate istraživanja iz opusa ove doktorske disertacije (Popović i sar., 2014). Tom prilikom analizirane su tri populacije sa dva podunavska lokaliteta (Đerdap i Fruška Gora, Srbija). Jedinke su, preliminarno, na osnovu morfoloških karaktera i sezone aktivnosti, razdvojene na dva taksona, tom prilikom prvi put označena kao *M. avidus* Rossi (analogan *M. avidus* A (Milankov i sar., 2001) i *M. moenium* Wiedemann (analogan *M. avidus* B (Milankov i sar., 2001). Đerdap je okarakterisan kao simpatrijski lokalitet, pri čemu su jedinke sakupljene u junu mesecu („prolećna generacija”) preliminarno identifikovane kao *M. moenium*, a one sakupljene u septembru („jesenja generacija”), kao *M. avidus*. Analiza varijabilnosti alozima potvrdila je postojanje dva različita taksona u okviru analiziranih populacija. Tri od pet analiziranih enzimskih lokusa pokazali su polimorfizam u sve tri analizirane populacije, dok su lokusi AAT i ME bili monomorfni u okviru svakog taksona (AAT lokus: fiskiran alel *a* u *M. avidus* populacijama, i alel *b* u *M. moenium* populacijama; ME lokus: fiksiran alel *b* u *M. avidus* populacijama i alel *a* u *M. moenium* populacijama). UPGMA dendrogram baziran na genetičkoj udaljenosti analiziranih populacija (Nei, 1978) prikazao je prisustvo dve klade- *M. avidus* (prolećna populacija sa Đerdapa) i *M. moenium* (jesenja populacija sa Đerdapa i populacija sa Fruške Gore). U okviru F statistike, $F_{st} > F_{is}$ relacija ukazala je na veći efekat genetičkog drifta u odnosu na lokalni inbriding. Ipak, činjenica da su F_{st} vrednosti bile različite po različitim analiziranim lokusima, eliminisala je genetički drift i protok gena kao najveće uzročnike genetičke diferencijacije između analiziranih populacija. Stoga je pretpostavljeno da su dominantan mehanizam ovog procesa bili različiti selekcionarni pritisci u okruženju *M. avidusa* i *M. moeniuma*, ne samo na različitim geografskim područjima, već i na istom staništu (Đerdap). Analiza COI sekvenci 23 jedinke navedenih populacija otkrila je prisustvo 10 haplotipova, od kojih su tri bila jedinstvena za *M. avidus*, šest za *M. moenium*, a jedan deljen od strane oba taksona. Za

razliku od UPGMA dendrograma baziranog na alozimskim podacima, parsimonijsko stablo bazirano na mitohondrijalnoj DNK nije uspjelo da odvoji dva kriptična taksona. Time je zaključeno da su se specifični aleli u okviru alozimske analize pokazali informativnijim za rešavanje taksonomskog statusa *M. avidus* kompleksa (Popović i sar., 2014).

Preliminarni rezultati ove teze, publikovani na osnovu materijala prikupljenog tokom proleća, leta i jeseni, sa većeg broja lokaliteta sa šireg geografskog područja, pojasnili su status *M. avidus* kompleksa (Popović i sar., 2015). Studija je obuhvatila 21 populaciju iz južne Evrope, Maroka i Turske i, na osnovu morfoloških karaktera, sezone aktivnosti jedinki, kao i geografske distribucije, predložila upotrebu naziva *M. avidus* (Rossi, 1790), *M. moenium* (Wiedemann, 1822) i *M. ibericus* (Vujić 2015; novi naziv za *M. bicolor* Gil i Collado, 1930; Walker, 1852). U radu su predstavljeni neotipovi za vrste *Merodon avidus*, *M. spinipes* (Fabricius, 1794) i *M. quadrilineatus* Lioy, 1864, kao i lektotip za *Merodon moenium*. DNK barkoding analiza bazirana na 3'COI sekvencama mitohondrijalne DNK obuhvatila je po jedan primerak iz svake od populacija (sa područja južne i srednje Evrope i Turske), inicijalno identifikovanih kao *M. avidus/M. moenium*, kojima je dodato i nekoliko sekvenci vrste *M. ibericus* (marokanske populacije). Neighbour-joining (NJ) analiza, kao i analize maksimalne verovatnoće (engl. *Maximum-likelihood*, ML) i maksimalne parsimonije (engl. *Maximum parsimony*, MP), jasno su razdvojile *M. bicolor* klaster od para *M. avidus/M. moenium*, kroz prisustvo dve odgovarajuće klade. U okviru 41 analizirane jedinke, identifikovano je 27 COI mtDNK haplotipa, definisanih kroz 36 varijabilne pozicije (7 singltona i 29 parasimonijski informativnih mesta). Diverzitet haplotipova na nivou ukupnih podataka iznosio je $h = 0,971$, diverzitet nukleotida $\pi=0,0206$, a prosečan broj nukleotidnih razlika $k = 12,998$. Ukupno 15 haplotipova pripalo je taksonu *M. ibericus*, 7 taksonu *M. avidus*, dok je 5 haplotipova zabeleženo kod *M. moenium*. Velik broj jedinstvenih haplotipova u okviru obe klade ukazao je na prisustvo intraspecijskog polimorfizma. Zabeleženo je potpuno odsustvo deljenih haplotipova, što je, uprkos tome što COI barkode nije uspeo da razdvoji *M. avidus* i *M. moenium* u dva klastera, navelo autore na analizu molekularne varijanse (AMOVA). Dobijeni podaci otkrili su statistički značajne procenke varijacija između vrsta. Takođe, Φ_{st} vrednosti bazirane na varijabilnosti COI sekvenci, bile su statistički značajne u komparacijama svih parova vrsta, pri čemu je razlika između *M. avidus/M. moenium* bila manja u odnosu na druga dva analizirana para (Popović i sar., 2015). S obzirom na to da je DNK analiza jasno

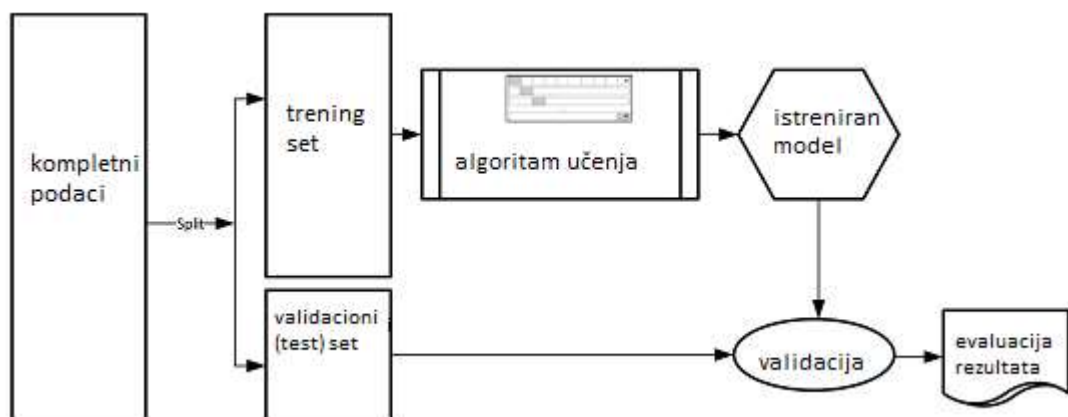
razdvojila samo *M. ibericus* od *M. avidus*/*M. moenium* para, populacije *avidusa* i *moeniuma* podvrgnute su ispitivanju alozimske varijabilnosti. Analiza varijabilnosti biohemijskih markera pružila je ovom prilikom nedvosmislen dokaz o postojanju dve vrste u okviru ove grupe, i kao takva je značajan deo ove doktorske disertacije, u koju je i uvrštena (Poglavlja 3.2 i 4.2).

Poslednje istraživanje *M. avidus* kompleksa obuhvatilo je integrativnu upotrebu geometrijsko-morfometrijskih prisupa i analize 5' kraja COI mtDNK gena (Ačanski i sar., 2016a). Geometrijsko morfološke analize rađene su na osnovu oblika krila, visoko nasledne karakteristike, kao i oblika surstilusa (dela genitalnog aparata mužjaka). Pretpostavljeno je da bi drugi karakter mogao biti značajan za mehanizam izolacije između kriptičnih vrsta osolikih muva (Rotheray i Gilbert, 2011), kao i da bi geo-morfometrijske analize mogle otkriti fine razlike u obliku, koje se ne mogu vizualizovati tradicionalnim ispitivanjem (Mutanen i Pretorius, 2007). UPGMA fenogrami bazirani na obe morfološke karakteristike ukazali su na prisustvo četiri različite vrste: *M. avidus*, *M. moenium*, *M. ibericus* i novoopisane *M. megavidus* i time dokazali statističku značajnost finih morfoloških razlika između para *M. avidus*/*M. moenium*. Istaknuto je postojanje razlika u obliku surstilusa između ove dve vrste, uprkos njihovoj mestimičnoj geografskoj približenosti i preklapanju, kao i pretpostavljenoj skoroj specijaciji. Osim što su povrdile klasifikaciju na *M. avidus* (Rossi, 1790), *M. moenium* (Wieseman, 1822) i *M. ibericus* (Vujić, 2015) (Popović i sar. 2015), geometrijsko-morfološke analize omogućile su, ovom prilikom, i identifikaciju četvrtog taksona *M. megavidus*. Ovom taksonu, ranije otkrivenom uporebom COI barkodinga i prvobitno označenom kao *Merodon* sp. nov. 2, (Ståhls i sar., 2009), ovom prilikom su dodati i prezentovani i dijagnostički morfološki karakteri (Ačanski i sar., 2016a). DNK filogenetičkom analizom dobijena su dva stabla, bazirana na pristupima maksimalne parsimonije i maksimalne verovatnoće, čija je topologija bila slična, te su se formirala tri klastera: *M. ibericus*, *M. megavidus* i klaster sa sekvencama *M. avidus* i *M. moenium*. UPGMA dendrogram, baziran na genetičkim distancama, bio je u skladu sa UPGMA fenogramom iz geometrijsko-morfološke analize. Na osnovu divergencije u sekvencama (p vrednost) COI gena, kao i relativne stope mutacija na milion godina za artropode (Brower, 1994), procenjeno je vreme divergencije ispitivanih taksona. Rezultati su ukazali na to da su se sve divergencije odigrale u Pleisocenu, od čega prvo divergencija *M. ibericusa* (pre oko 800.000 godina), dok je poslednja usledila divergencija između *M. avidusa* i *M. moeniuma* (pre oko 87.000 godina).

Na osnovu rezultata Ståhls i sar. (2009), Popović i sar. (2015) i Ačanski i sar (2016a), *M. avidus* kompleks sastojao se od četiri vrste: *Merodon avidus* Rossi 1790, *Merodon moenium* Wiedemann, 1822, *Merodon ibericus* Vujić, 2015 i *Merodon megavidus* Vujić i Radenković, 2016. Rezultati ove disertacije predstavljaju deo doprinosa razrešenju taksonomskog statusa *M. avidus* kompleksa.

2.3 Vršenje predikcije *Machine learning* tehnikama

Tehnološki razvoj u proteklih nekoliko decada rezultovao je pojavom većeg broja metoda za kompjuterska predviđanja, obuhvatajući različite matematičke i statističke pristupe, kao i MLe tehnike (engl. *machine learning*) bazirane na veštačkoj inteligenciji. MLe modeli predstavljaju širok spektar algoritama specijalizovanih za predikciju, među kojima se najšestće pominju neuronske mreže, modeli regresionih stabala i mreže vektora (Elith i sar., 2008). Za razliku od klasičnih statističkih pristupa, koji počinju proizvoljnim izborom određenog modela, kojim se, na osnovu ponuđenih parametara, vrši kompjuterska analiza podataka, MLe tehnike se služe algoritmom kako bi same utrdile vezu između prediktora (varijable) i izlazne informacije (Breiman, 2001). Ovakav proces teži ka tome da, posmatranjem ulaznih informacija i odgovora na njih, definiše dominirajuće obrasce, karakteristike i interakcije u okviru podataka, čime se znatno poboljšava sposobnost kreiranog modela da izvrši relevantnu predikciju (Elith i sar., 2008) (Slika 1).



Slika 1. Standardni koraci MLe tehnika u kreiranju i validaciji jednog prediktivnog modela.

2.3.1 Modelovanje distribucije vrsta

2.3.1.1 Osnove i biološka primena modelovanja distribucije

„Modelovanje distribucije vrsta” (engl. *Species distribution modelling*, SDM), u literaturi se sreće i pod nazivima: „Modelovanje ekološke niše”, „Modelovanje prostorne niše”, „Modelovanje stepena pogodnosti staništa”, kao i „Modelovanje bioklimatskog okvira”. Svi navedeni pojmovi odnose se na proces upotrebe kompjuterskih algoritama u predviđanju distribucije vrste u geografskom prostoru (Pearson, 2010). Ovaj metod zauzima značajno mesto među tehnikama konzervacionog planiranja u poslednjoj deceniji. Matematičkim algoritmima razvijani modeli, implementirani u odgovarajuće kompjuterske programe, predviđaju distribuciju vrsta, kombinujući postojeće podatke o prisutnosti vrsta sa odabranim sredinskim varijablama. Prediktori (sredinske varijable) sastoje se od digitalnih slojeva (engl. *layer*), a distribicioni modeli, povezivanjem poznate distribucije sa sredinskim podacima, identifikuju ekološke i/ili geografske uslove održivosti jedne ili više populacija. Ovakav pristup pronalazi značajnu primenu u konzervacionoj i evolucionoj biologiji, sa posebnim akcentom na konzervacionom planiranju. Upotreba modelovanja distribucije vrste može dovesti do:

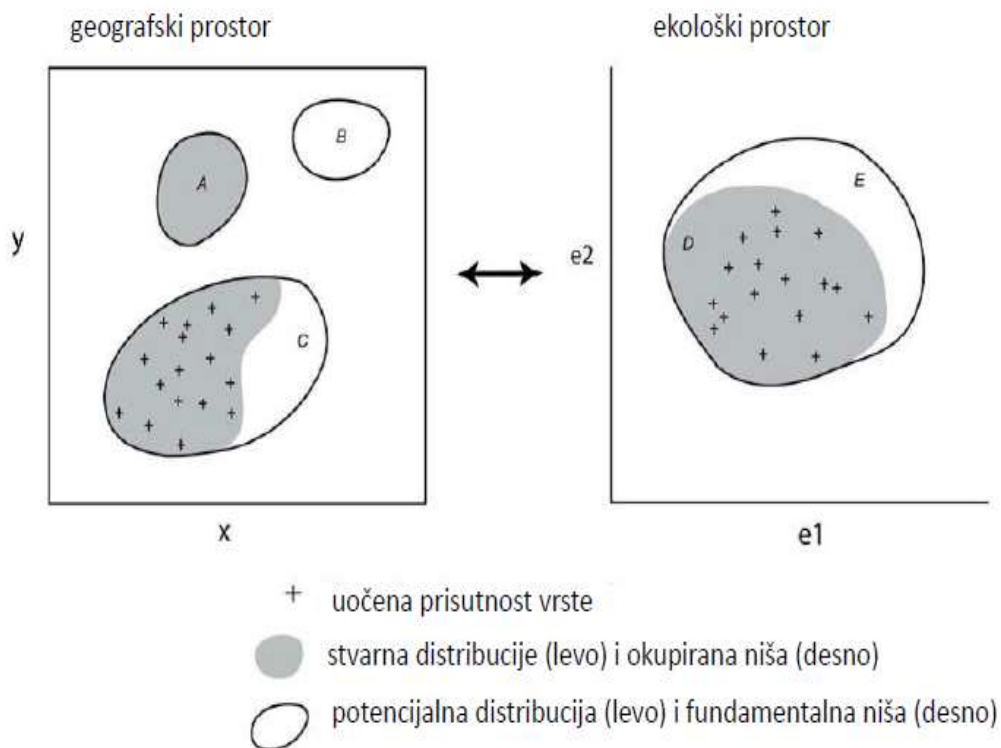
- 1) identifikacije područja u blizini onih koji su utvrđeni podacima o prisutnosti, za koja se očekuje da budu naseljena,
- 2) identifikacije dela područja stvarne distribucije, koji je do tad bio nepoznat i
- 3) identifikacije potencijalnih područja distribucije, koja još uvek nisu okupirana od strane vrste (Pearson, 2010).

Osnovne karaktersitike metodološkog pristupa modelovanja distribucije vrste su sledeće:

- 1) prostor koji se proučava je modelovan u formi mape, sastavljene od rešetke ćelija specifične rezolucije,
- 2) zavisna varijabla je trenutno poznata, uočena distribucija vrste,
- 3) set uvedenih ekoloških varijabli karakteriše svaku ćeliju rešetke i

4) funkcija ekoloških varijabli se kalibriše tako, da se svaka ćelija karakteriše kao pogodna ili nepogodna za ispitivanu vrstu (Hirzel i sar., 2002).

Za uspešno korišćenje ove metodologije neophodno je poznavanje definicije fundamentalne i okupirane ekološke niše, kao i stvarne i potencijalne distribucije vrste, na osnovu kojih se analizirana grupa stavlja u odgovarajući ekološki i geografski prostorni okvir. Hutchinson (1957) definisao je fundamentalnu nišu vrste kao set ekoloških uslova u okviru kojih se istoj omogućava da preživi i obitava. Nasuprot terminu „niše” koji odgovara ekološkom prostoru, geografski prostor, na kome se raspored vrsta može fizički interpolirati na mapi, nosi sa sobom termin „distribucije”. Dok uočeno pojavljivanje vrsta na određenom geografskom prostoru predstavlja „stvarnu distribuciju”, njena interpolacija na ekološki prostor definiše se kao okupirana niša-deo ekološkog okvira, koji u stvarnosti ta vrsta zauzima. Sa druge strane, ukoliko bismo ekološke uslove opisane pojmom fundamentalne niše reflektovali na geografski prostor, dobili bismo potencijalnu distribuciju vrste (Slika 2). Različiti biotički faktori (npr. prisustvo kompetitora ili odsustvo izvora hrane), ljudski faktori i geografske barijere dovode do razlike između potencijalne i stvarne distribucije posmatranih taksona (Pearson 2010).



Slika 2. Ilustrovani prikaz veze između teorijske distribucije vrsta u geografskom i ekološkom prostoru. Preuzeto i modifikovano iz Pearson (2010). **Legenda:** A-oblast stvarne distribucije vrste, za koju odsustvuju dokumentovani podaci o njenoj prisutnosti. B-ekološki pogodna oblast, koja nije deo stvarne distribucije (npr. zbog nemogućnosti vrste da dopre do nje, usled nepovoljnih uslova u susednom području) C-oblast potencijalne distribucije vrste, koja je takođe nenaseljena (npr. zbog kompeticije sa drugim vrstama) D-oblast okupirane niše; sivi pojas neposredno pored tačaka prisutnosti pokazuje da podaci o prisustvu ne omogućavaju uvek identifikaciju čitave okupirane niše E-neokupiran deo fundamentalne niše (npr. usled biotičkih interakcija ili geografskih barijera za disperziju vrste).

Modeli distribucije vrsta kalibrišu se, odnosno grade, u određenom ekološkom prostoru, a zatim se projektuju na zadati geografski okvir. Verovatnoća distribucije predstavlja odraz pogodnosti svake ćelije iz prostorne rešetke, kao funkcije ekoloških varijabli na poznatim tačkama prisutnosti. Projekcijom ove verovatnoće na geografski prostor, dobija se “mapa potencijalne distribucije” vrste. S obzirom na činjenicu da se model adaptira samo prema onom delu niše predstavljenom kroz unete podatke o prisutnosti, kao rezultat se ne detektuje čitava fundamentalna, niti okupirana niša, što je ujedno okarakterisano kao mana same tehnike distribucionog modelovanja (Lawton 2000, Hampe 2004).

Modelovanje distribucije vrsta može doprineti rešavanju različitih bioloških pitanja. Jedna od osnovnih primena navedenog pristupa predstavlja pomoć u planiranju terenskog rada i pronalaženju poznatih vrsta (Guisan i sar., 2006), kao i eventualno otkrivanje novih vrsta u području iste fundamentalne niše (Raxworthy i sar., 2003).

Predviđanje distribucije je i jedan od načina za evaluaciju potencijalnih klimatskih uticaja na neku vrstu (Iverson i Prasad, 1998; Berry i sar., 2002, Hannah i sar., 2005., Milanovich i sar., 2010, Milić i sar., 2013; 2019, Kaloveloni i sar., 2015). U istraživanju sprovedenom na 33 vrste salamandera, Milanovich i sar. (2010) ukazali su na to da, uprkos izvesnim ograničenjima navedene metode, postoji jasna potreba za upotrebom distribucionog modelovanja u projekciji klimatskih promena i potencijalnog gubitka diverziteta. Milić i sar. (2019) predvideli su da će kriptične vrste *M. atratus* kompleksa, pod uticajem budućih klimatskih promena, podleći gubitku areala staništa, sa tendencijom povlačenja u Alpe. Modelovanje distribucija novih, kriptičnih vrsta uputilo je na osnovanu pretpostavku o različitom odgovoru svake od njih na globalne klimatske promene, čime se ukazala potreba za uspostavljanjem različitih konzervacionih strategija za svaku kriptičnu vrstu ovog kompleksa. Predikciju budućih klimatskih efekata na rodu *Merodon*, upotrebom dva klimatska modela i tri različita scenarija promene klime, izvršili su i Kaloveloni i sar. (2015). Autori su došli do zaključka da će vrste adaptirane na veće nadmorske visine i geografske dužine, sa nižim temperaturnim karakteristikama, biti više pogođene potencijalnim klimatskim promenama, zbog značajnijeg gubitka areala njihovog staništa.

Predviđanje i mapiranje potencijalno odgovarajućeg staništa je kritičan korak kada je reč o istraživanjima ugroženih vrsta, sa krajnjim ciljem u praćenju prirodnih populacija, pokušajima reintrodukcije i odabiru lokaliteta u okviru konzervacionog menadžmenta (Araujo i Williams 2000; Ferrier i sar., 2002; Leathwick i sar., 2005; Kumar i sar., 2009, Milić i sar., 2019). Procena pogodnog staništa modelovanjem distribucije našla je primenu i u prognoziranju invazije vrsta (Higgins i sar., 1999; Thuiller i sar., 2005). Modelovanjem potencijalne distribucije za šest vrsta *Cheilosia proxima* grupe iz familije Syrphidae sa Balkanskog poluostrva, definisani su bioklimatatski parametri od najvećeg uticaja, kao i najznačajnije geografsko područje za navedenu grupu (Dinarske planine). Na ovaj način, modelovanje distribucije je pružilo doprinos daljem praćenju navedenih vrsta osolikih muva, kao i uspostavljanju adekvatnih konzervacionih mera za njihovo očuvanje (Milić i sar., 2013).

2.3.1.2 Modelovanje distribucije vrste u kontekstu specijacije

Polazeći od toga da se ova disertacija, pre svega, bavi delineacijom kriptičnih vrsta u okviru jednog kompleksa vrsta, značajno je istaći da modelovanje distribucije vrste pronalazi primenu i u ovakvim biološkim problemima. Navedeni pristup do sada je uspešno korišćen u razdvajanju vrsta (Raxworthy i sar., 2007, Vujić i sar., 2015; Šašić i sar., 2016; Ačanski i sar., 2016b, Radenković i sar., 2018a; Milić i sar., 2019), kao i u sagledavanju mehanizama specijacije (Graham i sar., 2004; Kozak i Wiens, 2006). Wiens i Graham (2005) ukazali su na to da modelovanje ekološke niše može pružiti dokaz o geografskoj izolovanosti populacija. Oni navode da je, ukoliko su dve populacije odvojene regionom koji leži izvan okvira njihove ekološke niše, verovatnoća postojanja protoka gena između njih mala, što podržava tezu da se iste mogu smatrati odvojenim vrstama. S obzirom na malu verovatnoću protoka gena u ekološki nepovoljnim regionima, autori navode zaključak o različitim linijama porekla analiziranih populacija. Ovakav scenario geografske izolacije sestrinskih vrsta predviđa situaciju u kojoj su: 1) niše slične, te jedna vrsta može da se koristi u predviđanju niše druge (konzervativizam niše) (Peterson i sar., 1999), ili 2) niše različite, pri čemu je interprediktivnost distribucije između vrsta slaba (Wiens i Graham, 2005).

Peterson i sar. (1999), kao i Kozak i Wiens (2006) utvrdili su konzervativnost niša između ispitivanih sestrinskih vrsta i sugerisali da je niži nivo evolucije mogao olakšati alopatričku specijaciju vrsta, kao odgovor na promenljive ekološke uslove. Drugi autori su pronašli značajnu plastičnost niša između sestrinskih ili blisko vezanih vrsta (Losos i sar., 2003; Graham i sar., 2004), ili, pak, generalni nedostatak veze između sličnosti niša i filogenetičke sličnosti (Knouft i sar., 2006). Takođe su zabeleženi i dokazi o intraspecifičnoj varijaciji ekoloških niša (Peterson i Holt, 2003). Ipak, čak i u slučaju konzervativnih niša kriptičnih vrsta, njihovo modelovanje može pomoći u detektovanju skrivenih taksona. Kozak i Wiens (2006) su utvrdili da alopatrički sestrinski taksoni, generalno, naseljavaju slične klimatske niše., kao i da konzervativizam klimatskih niša i određene, manje prostorne klimatske razlike mogu, zajedničkom interakcijom, promovisati specijaciju. Prema Wiens (2004), ukoliko bi se određena ekološka promena na geografskom prostoru između dva seta populacija desila brže nego adaptacija na ove nove ekološke uslove, rezultat bio fragmentacija izvornog geografskog areala vrste. Upotreba Metoda modelovanja ekološke niše dokumentovana je i u cilju razdvajanja kriptičnih vrsta,

u studiji baziranoj na gekonima, u okviru kompleksa *Phelsuma madagascariensis* i *Phelsuma dubia* (Raxworthy i sar., 2007). Za modelovanje ekološke niše izabran je metod maksimalne entropije, u okviru programskog softvera MAXENT 2.3 (Phillips i sar., 2006). Maxent je MLe (engl. *machine learning*) program baziran na maksimalnoj entropiji, koji procenjuje verovatnoću prisustva vrste, uzimajući u obzir njena ekološka ograničenja. Njegova ideja je procena verovatne distribucije, putem pronalaženja distribucije maksimalne entropije (najbliže uniformnoj) na proučavanom području, na osnovu podataka prisutnosti i ekoloških varijabli. Navedena studija koristila je princip maksimalne entropije u cilju delinacija potencijalnih vrsta, poredeći modele niša baziranih na različitim varijantama taksonomskih grupisanja. Mapa dobijena na osnovu tri podvrste tretirane pojedinačno mnogo je više odgovarala poznatoj distribuciji navedenih populacija, u odnosu na kombinovani model, u kome se čitava grupa tretirala kao jedna vrsta. Utvrđeno je da u oba kompleksa vrsta *Phelsuma*, bliski taksoni zauzimaju divergentne niše, koje pokazuju mali stepen prostornog preklapanja, prilikom projekcije na geografski prostor. Molekularna analiza potvrdila je rezultate dobijene modelovanjem ekološke niše (Raxworthy i sar., 2007).

2.3.1.3 Modelovanje distribucije u okviru roda *Merodon* (Diptera: Syrphidae)

Uspešna upotreba modelovanja distribucije vrsta demonstrirana je i na osolikim muvama (Milić i sar., 2013, 2019; Vujić i sar., 2015; Kaloveloni i sar., 2015; Ačanski i sar., 2016b; Šašić i sar. 2016). U već pomenutoj studiji baziranoj na modelovanju distribucija kriptičnih vrsta u okviru kompleksa *Merodon atratus*, poređenje ekoloških niša vršeno je u cilju zaštite njihovog biodiverziteta (Milić i sar., 2019). Autori su utvrdili da, uprkos visokog nivoa morfološke sličnosti, sve tri kriptične vrste (*M. atratus*, *M. balcanicus* i *M. virgatus*) ispoljavaju različite odgovore na globalne klimatske promene, čime zahtevaju pojedinačne konzervacione strategije.

U ispitivanju divergencije ekoloških niša vrsta u okviru grupe *Merodon ruficornis*, (Diptera: Syrphidae), projekcije ekoloških niša sprovedene su upotrebom programskog paketa MAXENT, principom traženja distribucije maksimalne entropije (Ačanski i sar., 2016b). Analiza je obuhvatila 12 morfološki sličnih vrsta raspoređenih u okviru 4 klastera *M. ruficornis* grupe, uz pretpostavku da se kod geografski izolovanih populacija, odigrala

specijacija, te dovela do formiranja bliskih vrsta u različitim delovima prostornog okvira zajedničkog pretka (Vujić i sar., 2012). Nakon modelovanja distribucije, računato je preklapanje dobijenih niša unutar svakog pojedinačnog klastera, testovima identičnosti i sličnosti, upotrebom Šonerovog D indeksa (Schoener, 1968). Navedene analize pokazale su razliku u ekološkim nišama u sva četiri klastera i između svih parova vrsta, izuzev između parova *M. ovaloides/M. turcicus* i *M. ovaloides/M. loewi*. Utvrđeno je da 8 od 12 ispitivanih vrsta obitava na području od 1000 do 2000m nadmorske visine, dok malobrojne vrste iznad 2000m uglavnom predstavljaju endeme. Ovakve vrste naseljavaju planinske vrhove u južnoj Evropi i severnoj i istočnoj Turskoj, između kojih je protok gena ograničen, te gotovo svaki vrh ima svoju endemsku vrstu. Mediteranski basen, sa druge strane, označen je kao „hotspot” područje za rodove u okviru porodice osolikih muva (Ačanski i sar., 2016b).

U studiji koncentrisanoj na *nanos* grupu roda *Merodon*, modelovanje distribucije predstavljalo je deo pristupa kojim su opisane tri nove kritične vrste: *Merodon kopensis* sp.n., *M. neonanus* sp.n. i *M. rasicus* sp.n. Za svaku od ovih vrsta definisani su i upoređeni ekološki profili i kreirane mape odgovarajuće mape distribucije. Između svih novoopisanih vrsta utvrđene su razlike u njihovim nišama, a istaknuto je da su istočna Anatolija i južni Egejski region Turske područja najbogatija vrstama navedene grupe (Vujić i sar., 2015).

U integrativnoj analizi vrsta *M. aureus* grupe, autori su potvrdili prisustvo morfološki kriptičnih vrsta *M. atrataus* stat.nov, *M. balkanicus* sp. nov. i *M. virgatus* sp.nov, istakavši da novi taksoni čine *M. atratus* kompleks. Modelovanje distribucije vrste pružilo je potporu molekularnim i morfometrijskim analizama, sugerišući niske vrednosti preklapanja modelovanih niša. Testovi sličnosti i identičnosti niša, kao i background testovi odbacili su hipoteze o sličnosti i ekvivalenciji niša i podržali pretpostavku o postojanju ekološke diferencijacije između parova analiziranih vrsta. Na ovaj način, ekološko modelovanje doprinelo je rešavanju taksonomskog statusa navedenih kriptičnih taksona (Šašić i sar., 2016).

U istraživanju baziranom na populacijama blisko vezanih taksona (*M. ibericus*, *M. megavidus*, *M. avidus* i *M. moenium*) u okviru kompleksa vrsta *Merodon avidus* sa područja Evrope, Turske i Maroka, osnovni cilj je bio otkrivanje genetičke diferencijacije između kriptičnih taksona, sa posebnim fokusom na potvrđivanju taksonomskog statusa kriptičnih vrsta *M. avidus* i *M. moenium*. Pored molekularne analize DNK sekvenci (5'COI

regiona mitohondrijalne DNK), i analize alozimske varijabilnosti, urađena je i analiza ekoloških niša navedenih taksona, analizom glavnih komponenata (PCA) (Popović i sar., 2015). U analizu ekoloških niša uključeno je 2037 uzoraka (od toga 1185 *Merodon avidus* i 857 *Merodon moenium*) sa podacima o njihovim lokalitetima, kao i podacima o nadmorskoj visini i 19 bioklimatskih varijabli, konstruisanih na osnovu podataka iz WorldClim baze (Hijmans i sar., 2005). PCA je rađena u 4 PC ose, koje najbolje opisuju geografsku distribuciju odabranih taksona, u cilju sumiranja multidimenzionalnih ekoloških varijabli, te poređenja ekoloških niša ispitivanih vrsta. ANOVA i Tukey test pokazali su veliku značajnost hipoteze o dve odvojene vrste ($p \leq 0,01$), u sve 4 PC ose. Precipitacija kao ekološki faktor bila je odgovorna za 70% ekološke varijanse, dok je razlika u nadmorskoj visini bila odgovorna za samo mali deo razlika u ekološkim nišama (9%). Precipitacija tokom najtoplijeg i najsuvljeg kvartala u godini pokazala se kao odgovorna za užu ekološku nišu *M. moeniuma*. Iako su ekološki afiniteti oba taksona bili, po svim PC osama, značajno različiti, deo ekološkog prostora bio je zajednički. Istaknuto je da je preklapanje u ekološkom prostoru posledica već poznate činjenice da *M. avidus* i *M. moenium* nisu geografski izolovane vrste, već dele uzak deo geografskog prostora i povremeno se javljaju na istim lokalitetima, uz temporalnu divergenciju. Takođe je naglašeno da preklapanje ekološkog prostora može biti rezultat skore specijacije, koja je pretpostavljena i na osnovu genetičkih podataka (Popović i sar., 2015).

Uspešna implementacija modelovanja distribucija vrsta u kontekstu potvrde njihovog razdvajanja (Raxworthy i sar., 2007), kao i objašnjavanja specijacije kod drugih kompleksa vrsta roda *Merodon* (Vujić i sar., 2015; Šašić i sar., 2016; Ačanski i sar., 2016b), ukazala je na osnovanost upotrebe navedenog pristupa i u okviru kompleksa vrsta *Merodon avidus*. Značajni rezultati i smernice dobijeni analizom glavnih komponenata kod *M. avidus* kompleksa (Popović i sar., 2015), koja ne predstavlja klasičan SDM metod, ali koristi iste ulazne komponente i takođe rezultuje zaključcima o ekološkim nišama taksona, nameću Modelovanje distribucije kao logičan korak u istraživanju ove taksonomske grupe.

2.3.2 Veštačke neuronske mreže i njihova primena u biologiji

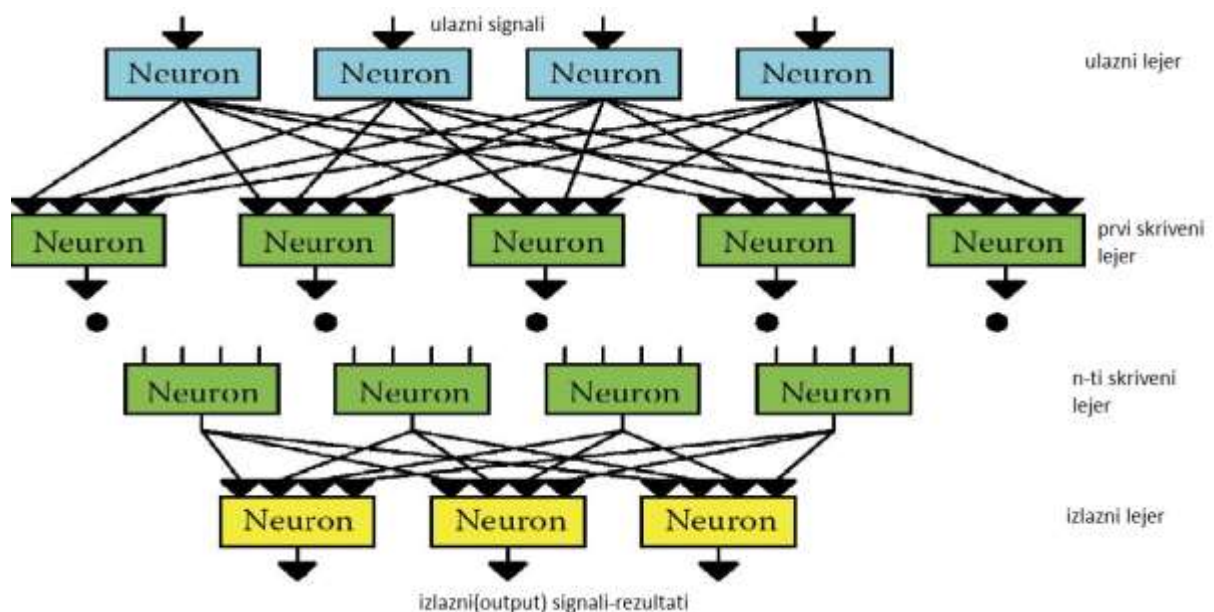
Kompjuterski model neuronskih mreža, baziran na matematici i algoritmima koji se oslanjaju na „logiku praga” (engl. *threshold logic*), prvi put je kreiran davne 1943. godine (McCulloch i Pitts, 1943). Ovaj model utabao je stazu za sva dalja istraživanja u ovoj oblasti, koja su se, u osnovi, podelila na dva pristupa. Jedna grupa istraživača fokusirala se na bolje razumevanje procesa koji se odvijaju u ljudskom mozgu, dok je drugi pristup obuhvatio primenu samih neuronskih mreža u veštačkoj inteligenciji.

Veštačke neuronske mreže (engl. *artificial neural networks-ANN*) su kompjuterski sistemi inspirisani biološkim neuronskim mrežama u okviru ljudskog mozga. To su nelinearne mapirajuće strukture bazirane na funkcionisanju ljudskog nervnog sistema. Ovakvi sistemi imaju sposobnost učenja zadataka, odnosno, progresivnog poboljšanja svoje funkcije, na osnovu razmatranja unetih primera. Dizajnirane su i osmišljene tako da mogu da sprovedu univerzalnu i visoko fleksibilnu funkcionalnu procenu bilo koje vrste podataka. Ovo ih čini izuzetno efikasnim alatom za kreiranje različitih modela, naročito u slučajevima kada su veze između podataka kompleksne i/ili nepoznate (Lek i Guégan, 1999).

ANN se sastoje od grupe povezanih jedinica, ili čvorova, koji se, analogno biološkim neuronima, nazivaju veštački neuroni. Svaka konekcija između njih (analogna sinapsi) može da transmituje signal od jednog do drugog veštačkog neurona, koji ga procesuiraju i prosleđuju sledećem neuronu u sinapsi. Za matematički model veštačkih neurona, koristi se naziv „perceptron”. Dok dendriti bioloških neurona primaju električne signale sa aksona drugih neurona, u perceptronu su ovi električni signali predstavljeni kroz numeričke, vektorske vrednosti. Fenomen da nervna transmisija u biološkim sinapsama zavisi od jačine signala, te neuron „prosleđuje” izlazni signal samo ukoliko je ulazni signal dosegao izvestan prag, implementiran je, uz pomoć odgovarajućih algoritama, i u perceptron. Tako se u perceptronu pripisuje određena „težina” svakom numeričkom ulaznom signalu. Ona se, na nivou većeg broja ulaznih informacija, pretvara u sumarnu težinu ulaza („input vektor” ili „težinski vektor” perceptrona), kojom se određuje informacija na izlazu (Royas, 1996).

Neuronske mreže imaju veliki kapacitet za pravljenje prediktivnih modela, pri čemu se ANN trenira unetim karakterima, nakon čega se dobija identifikacija (predikcija) rezultata.

Proučavanje ANN dovelo je do razvoja nekoliko tipova neuronskih mreža, pogodnih za rešavanje različitih tipova problema. Najčešće korišćen tip mreže je BPN (engl. *backpropagation network*), koja se takođe naziva i multi-lejer perceptron. Njena struktura se sastoji od jednog ulaznog sloja, jednog ili više skrivenih, i jednog izlaznog sloja (Slika 3). Konstrukcija modela u okviru BPN vrši se na osnovu podataka sa već poznatim izlaznim podacima i sastoji se od trening i test faze. U prvoj fazi, set input-output primera prezentuje se mreži veliki broj puta, nakon čega se, u test fazi, testira uspešnost funkcije mreže (Lek i Guégan, 1999). BPN su bazirane na specifičnom algoritmu (engl. *backpropagation algorithm*), predstavljenom prvi put od strane Webos (1974), koji računa procenat greške u svakom neuronu, nakon procesuiranja izvesne količine podataka. Za ovaj proces je jedinstvena sposobnost svakog neurona da se adaptira. Adaptacija podrazumeva proces individualnih korekcija, koje zavise od prethodno podešenog praga za vrednost greške. Korekcije se vrše promenom vrednosti koeficijenata težina na svim ulaznim podacima (inputima) perceptrona, pod kontrolom navedenog algoritma. Vrednosti težina se „popravljaju” u više ponavljanja (iteracija), kroz seriju neurona u okviru svake sinapse, sve dok mreža ne bude podešena tako da se predikcija vrši uz nivo greške koji je prihvatljivo nizak (Popović i Popović, 2017). Ovako podešena BPN predstavlja izuzetan sistem, sposoban za predviđanje kompleksnih veza između podataka.



Slika 3. Šematska ilustracija BPN mreže, sačinjene od većeg broja slojeva (lejera).

Preuzeto i modifikovno iz Tadeusiewicz i sar. (2014)

Veštačke neuronske mreže doživele su rapidan razvoj početkom devedestih godina XX veka. Prve biološke primene ANN našle su mesto u oblastima molekularne biologije i medicine (Lerner i sar., 1994; Albiol i sar., 1995; Faraggi i Simon, 1995; Lo i sar., 1995), a kasnije su implementirane i u ekologiji (Lek i sar., 1996, Gevrey i Worner, 2006, Zhang i Wei, 2009; Zhang, 2010, 2011). Primeri njihove ekološke primene su uspostavljanje veze između gradskih područja i stepena kontaminacije travnatih vrsta biljaka (Dimopoulos i sar., 1999), kao i modelovanje prisustva određenih životinjskih vrsta na zadanom području (Joy i Death, 2004). Uz pomoć ANN modelovana je i distribucija patogenih vrsta bakterija, u zavisnosti od abiotičkih (regionalni klimatski faktori) i biotičkih (regionalna zastupljenost biljaka-domaćina) varijabli (Watts i Worner, 2012). Jedna od analiza neuronskih mreža bavi se testiranjem njihove efektivnosti u predikciji i dokumentaciji ekološkog uzorkovanja (Zhang i Barrion, 2008). Polazeći od potreba istraživača da predvide biološku strukturu, odnosno, taksonomsku kompoziciju ekoloških područja od interesa za sakupljanje uzoraka, izvršena je aproksimacija veze između veličine uzorka i bogatstva vrsta, upotrebom dva tipa veštačkih neuronskih mreža. Istovremeno je i demonstrirana sposobnost neuronskih mreža da dokumentuju unete podatke. Analizom 60 uzoraka artropoda različite veličine, uočeno je da aproksimacija broja taksona istreniranog BPN modela odgovara uočenim podacima o bogatstvu vrsta u poznatim uzorcima. Uz isticanje da je potrebno nastaviti sa testiranjem efikasnosti veštačkih neuronskih mreža, autori su preporučili njihovu upotrebu u aproksimaciji i dokumentaciji podataka o uzorkovanju (Zhang i Barrion, 2008). Veliki broj ekoloških istraživanja pokazao je da se, upotrebom veštačke inteligencije, postiže veća uspešnost u odnosu na klasične metode modelovanja (Lek i Guégan, 1999). U jednoj od svojih sudija, već pomenuti autor je razvio neuronsku mrežu sa ciljem da simulira zavisnost diverziteta artropoda od kompozicije biljnih vrsta na travnatom području (Zhang, 2011). Zabeleženo je 17 biljnih familija i veći broj, uglavnom insektnih, redova artropoda (uključujući i red Diptera), nakon čega je konstruisana neuronska mreža od tri sloja. Upotrebom algoritma pogodnog sa procenu bioloških interakcija (Zhang, 2007), dobijena je složena mreža interakcija između biljaka i artropoda. Poređenjem rezultata dobijenih neuronskom mrežom sa konvencionalnim matematičkim modelima, zaključeno je da su neuronske mreže superiorniji alat u modelovanju prisustva artropoda spram biljne kompozicije (Zhang, 2011).

Neprekidan razvoj tehnologije i mogućnost kreiranja jedinstvene neuronske mreže, ciljano konstruisane i istrenirane za rešavanje specifičnih problema, učinili su da veštačka

inteligencija postane jedna od najinteresantnijih tema današnje nauke. Stoga je i deo rezultata ove disertacije baziran na modelovanju podataka veštačkim neuronima.

2.3.3 Primena regresionih stabala u ekološkom modelovanju

U cilju pronalazjenja modela kojim se mogu opisati postojeći ekološki obrasci ili predvideti nove situacije, značajno mesto u savremenoj nauci, uključujući ekološka istraživanja, zauzimaju predikcioni modeli zasnovani na klasifikaciji i regresiji (De'ath i Fabricius, 2000; Vayssières i sar., 2000; De'ath, 2002). Ovi modeli omogućavaju kvantifikaciju veze između zavisne i nezavisne varijable, identifikaciju varijable sa najvećim doprinosom u razjašnjavanju datog problema, kao i ukazivanje na optimalne ekološke uslove i predikciju novih ekoloških situacija. BRT metoda (engl. *boosted regression trees*, BRT) je jedna od MLe tehnika, koja kombinuje prednosti dva algoritma: modela regresionih stabala (u kome se odgovor na prediktore ogleda kroz razdvajanja stabala u binarnom obliku) i „bustinga” (adaptivne metode koja kombinuje veliki broj jednostavnih modela u cilju postizanja visoke prediktivne sposobnosti) (Elith i sar., 2008). BRT pristup za povećanje tačnosti modela počiva na ideji da je jednostavnije pronaći i uprosečiti veći broj pravila, nego detektovati jedno, visoko-precizno pravilo predikcije (Schapire, 2003). U odnosu na tradicionalne metode regresije, koji rezultuju kreiranjem jedinstvenog, najboljeg modela predikcije, busting tehnika kreira i kombinuje veliki broj, relativno jednostavnih, modela stabala, optimizujući na taj način, svoj prediktivni domet (Elith i sar., 2006, Leathwick i sar., 2006, 2008). To je postepena procedura, u kojoj se regresiona stabla iterativno prilagođavaju trening podacima, u cilju poboljšanja karakteristika modela koji se kreira. Sukcesivnim formiranjem stabala na podešenim stablima iz prethodnih ciklusa, proces se progresivno fokusira na one segmente podataka, koji su najteži za predvideti. U svakom koraku procedure, pojedinačni podaci se klasifikuju po težinama, u zavisnosti od tačnosti njihove klasifikacije u prethodnom ponavljanju. Na taj način, pogrešno klasifikovani podaci nose veću težinu, čime postaju prioriterniji u procesu treniranja, te se povećava i šansa za njihovu tačnu klasifikaciju (De'ath, 2007). Finalni BRT model je linearna kombinacija velikog broja stabala (obično na stotinu ili hiljadu), a podešene vrednosti modela računaju se sumiranjem vrednosti svakog stabla i multiplikacijom sa prethodno podešenom stopom učenja samog sistema (Elith i sar., 2008).

Busting regresionih stabala do danas je prerastao u grupu od nekoliko tehnika, a busting algoritmi variraju u načinu kvantifikacije efektivnosti modela i selekcije podešavanja za sledeći ciklus ponavljanja. Podtehnika GBM (engl. *gradient boosting machine*) se, kroz nekoliko analitičkih poređenja sa ostalim MLe tehnikama, pokazala kao superioran BRT alat, zahvaljujući jednostavnoj upotrebi i izuzetnoj tačnosti predikcije (Phoboo, 2014; Adam-Bourdarios i sar., 2015). Prediktori (varijable kojima se vrši predviđanje) mogu biti bilo kog tipa (numeričkog, binarnog, kategoričkog itd.), što znatno olakšava pripremu podataka. Testirajući prediktivnu sposobnost ove metode u predviđanju biološke aktivnosti odabrane grupe molekula, Mustapha i Saeed (2016) su ukazali na to da GBM, pored visoke uspešnosti u tačnosti predikcije, poseduje autonomnu sposobnost za rad sa visoko divergentnim i složenim spektrom varijabli. Hijerahijska struktura rezultujućih stabala podrazumeva da odgovor na svaku ulaznu varijablu zavisi od ulaznih vrednosti na „više” pozicioniranim stablima, čime interakcije između prediktora bivaju automatski modelovane (Elith i sar., 2008). Želeći da demonstriraju prednosti BRT analize u ekološkoj primeni, Elith i sar. (2008), izvršili su analizu distribucije slatkovodne ribe *Anguilla australis*. U cilju kreiranja modela koji identifikuje ekološke varijable ključne za distribuciju analizirane vrste, sa potencijalnom primenom u predviđanju njenog prisustva i verovatnoće ulova u neuzorkovanim rečnim površinama, korišćeni su podaci o prisustvu vrste, set od 11 ekoloških varijabli, kao i jedna kategorička varijabla (metod hvatanja ribe). Dobijeni modeli pokazali su visoku prediktivnu sposobnost i rezultovali predviđanjem koje je bilo u skladu sa poznatim ekološkim odlikama ispitivane vrste, a autori su istakli značajnost uključivanja MLe metoda u dalje ekološke analize (Elith i sar., 2008).

U odnosu na veštačke neuronske mreže, BRT tehnika se pokazala jednostavnijom za pripremu podataka (D’earth, 2007). Kao i neuronske mreže, karakteriše je mogućnost simulacije podataka koji nedostaju, korišćenjem surogatnih informacija (Breiman i sar., 1984). Polazeći od činjenice da se obimne, decenijama formirane biološke baze podataka, često suočavaju sa gubitkom ili inicijalnim odsustvom pojedinih informacija, ovakva sposobnost BRT i NN metoda mogla bi biti od potencijalnog značaja. Navedeni problem, uočen i unutar baze podataka vrsta porodice Syrphidae, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, koja je pružila najveći deo materijala za ovu doktorsku disertaciju, učvrstio je i detaljnije profilisao ideju primene BRT i NN tehnika predikcije u okviru kompleksa vrsta *Merodon avidus*. Dosadašnja istraživanja, kao i preliminarna genetička istraživanja ove disertacije, utvrdila su diferencijaciju kriptične vrste *M. avidus* od vrste *M. moenium*

kao taksonomski najzahtevniju, te dovela do ideje o primeni neuronskih mreža i BRT tehnike u kreiranju modela za determinaciju jedne od navedene dve vrste u određenoj bazi podataka (realizovanu i prezentovanu u poglavljima 5.2.6 i 6.4). Ovako istreniran model bio bi sposoban da, na osnovu jedne ili više odabranih varijabli, sa visokom verovatnoćom odredi vrstu kojoj uzorak pripada, čime bi bila prezentovana potencijalna primena navedenih sistema u podršci inicijalne determinacije novih uzoraka, u slučajevima njihove sporne identifikacije.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Merodon avidus (Diptera:Syrphidae) je široko rasprostranjen kompleks kriptičnih vrsta, koji se odlikuje velikom morfološkom varijabilnošću (Speight, 2017). Prisutne veoma suptilne interspecijske razlike kao i sezonska varijabilnost morfoloških karakterata vrste *M. avidus* otežavaju sigurnu identifikaciju, te ovaj kompleks vrsta i dalje predstavlja taksonomski izazov.

Istraživanje obuhvaćeno ovom doktorskom disertacijom pred sobom je imalo sledeće ciljeve:

- Kvantifikovati genetičku varijabilnost prirodnih populacija *Merodon avidus* kompleksa, uzorkovanih sa širokog geografskog područja tokom čitavog perioda aktivnosti adalata, upotrebom različitih molekularnih markera (alozima i različitih krajeva COI mtDNK gena)
- Uz pomoć molekularnih rezultata razrešiti taksonomski status vrsta *M. avidus* kompleksa.
- Genetičkim pristupom utvrditi taksonomski status sinhronih i simpatričkih populacija *M. avidus* i *M. moenium* sa Krfa i Korzike.
- Razjasniti pitanje taksonomske upotrebe naziva *Merodon hikmeti* (Hurkmans i Hayat, 1997).
- Potvrditi hipotezu o prisustvu četiri odvojene vrste unutar *M. avidus* grupe, formiranu na osnovu morfoloških i molekularnih indicija, klimatsko–geografskih karakteristika lokaliteta koje jedinke naseljavaju, sezone aktivnosti jedinki, kao i na osnovu prethodnih istraživanja.
- Definisati distribuciju i klimatske profile vrsta u okviru *M. avidus* kompleksa i protumačiti dobijene podatke u kontekstu sticanja šire ekološke slike analiziranih vrsta, kao i učvršćivanja premise o njihovoj diferencijaciji.
- Prezentovati mogućnost primene veštačke inteligencije, u formi neuronskih mreža i tehnike regresionih stabala, u determinaciji neidentifikovanih i sporno identifikovanih jedinki.

4. RADNA HIPOTEZA

Radne hipoteze ovog istraživanja su sledeće:

- Odabrani enzimski lokusi predstavljaju dijagnostičke biohemijske markere, sposobne da ukažu na prisustvo genetičke diferencijacije između pojedinih kriptičnih vrsta proučavanog kompleksa.
- U okviru dijagnostičkih enzimskih lokusa može se očekivati prisustvo jedinstvenih alela, karakterističnih za svaku od analiziranih vrsta.
- COI gen mtDNK je odgovarajući marker za genetičku karakterizaciju kompleksa vrsta *M. avidus*, kao i za rasvetljavanje taksonomskih i filogenetičkih pitanja od interesa.
- Varijabilnost COI markera može da ukaže na genetički diverzitet u okviru analiziranog kompleksa, a jedinstveni COI haplotipovi na prisustvo kriptičnih vrsta.
- Specijacija kriptičnih vrsta odigrala se pod uticajem geografskih barijera, klimatskih promena i razlika u ekološkim faktorima na odvojenim, ali i na istim staništima, tokom različitih perioda evolucione istorije.
- Tehnike veštačke inteligencije predstavljaju pouzdan alat za kreiranje odgovarajućih modela ekoloških predviđanja, sposobnih da pruže potporu genetičkim dokazima o prisustvu genetičke diferencijacije vrsta i olakšaju determinaciju sporno identifikovanih jedinki.

5. MATERIJAL I METODE

5.1 Materijal

Analizama u okviru ove doktorske disertacije obuhvaćene su ukupno 2.503 jedinke iz *M. avidus* kompleksa sa područja Palearktika. Materijal je sakupljan tokom terenskih istraživanja na teritorijama Evrope, male Azije i severne Afrike u periodu od 1996. do 2017. godine i deponovan je sledećim muzejskim zbirkama: Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu (FSUNS), centar za Biodiverzitet Naturalis (NBCN), Lajden, Holandija, Prirodnjački muzej, London, Ujedinjeno Kraljevstvo (BMNH); Departman za zoologiju, Nacionalni muzej, Prag, Češka Republika (MNHP); Makedonski muzej nacionalne istorije (NHMW); Prirodnjački muzeju, Beograd, Srbija (NHMBEO); Univerzitet Tel Aviv, Tel Aviv, Izrael (TAU); Egejski univerzitet, Mitilena, Grčka (MAEU); Svetski muzej Liverpool, Liverpool, Ujedinjeno Kraljevstvo; Prirodnjački muzej, Berlin, Nemačka (ZMB); Muzej prirodne istorije Danske, Zoološki muzej, Kopenhagen, Danska (ZMUC), kao i u privatnim kolekcijama: A. Simank (AS), Nemačka; M. Bartak (MB), Češka Republika; C.Klauzen (CC), Nemačka; D. Dožkal (DD), Nemačka; G. Ståhls (GS), Finska; J.Smit (JS), Holandija; M.J. Smart (MJS), Ujedinjeno Kraljevstvo; Martin Hauser (MH), Sjedinjene američke države; C. Palmer (CP), Ujedinjeno Kraljevstvo i V. Vejer (VW), Belgija.

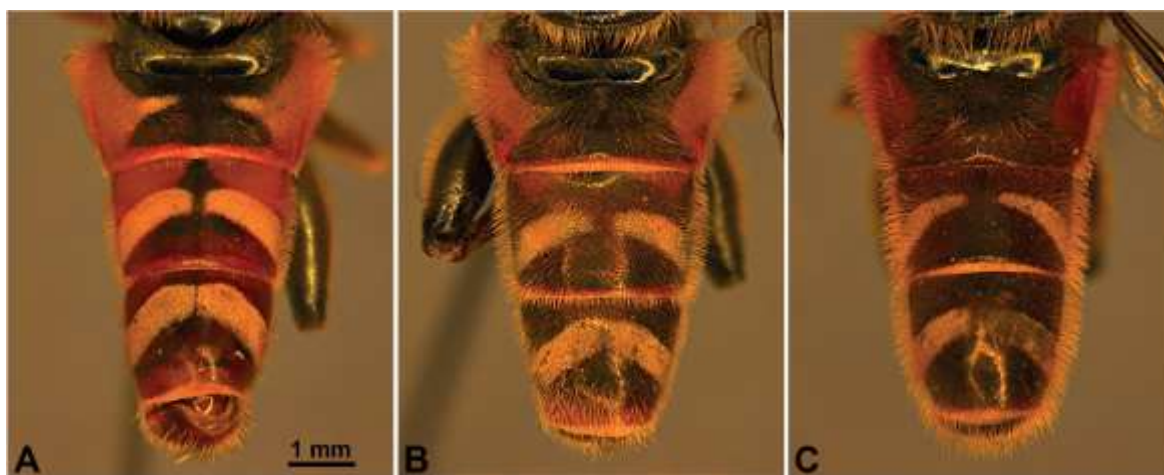
Materijal korišćen za DNK analize obuhvatio je ukupno 250 jedinki sa područja zapadne, centralne i južne Evrope, Maroka i Turske (Tabele 1-3-Prilog). Primerici *M. avidus* kompleksa prikupljeni su u različitim sezonama terenskog istraživanja. Sve primerke identifikovali su prof. dr Ante Vujić i prof. dr Snežana Radenković i isti su označeni jedinstvenom šifrom u bazi podataka novosadskog Departmana za Biologiju i Ekologiju. Deo sekvenci 3' regiona COI gena, objavljenih od strane Milankov i sar.(2009), preuzete su iz Gen Banke (Tabela 1, Prilog). Eksperimentalne analize jedinki sa kodovima: A22a, A25a, A27a, A29a, A32a, C17-18, C21, C98, D6-10, G1167, G1557, G1592, G1794, G2348-51, G2366, G2368, G2527-29, G2620-22, G2626-27, K7-10, L23-27, M17, O92, U28, Y1158-64, Y1206, Y1208, Y1213, Y1638-39, Y592, Y940-44, Z60, Z64-66 urađene su u Finskom muzeju nacionalne istorije, pri Univerzitetu u Helsinkiju, Finska, uz

dobijenu saglasnost za njihovo uključanje u ovu disertaciju. Eksperimentalne analize ostalih jedinki urađene su u Laboratoriji za genetiku, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, pri čemu je deo sekvenci 5' regiona COI gena, objavljenih u istraživanju Popović i sar. (2015), pohranjen u Gen Banku (Tabela 2, Prilog).

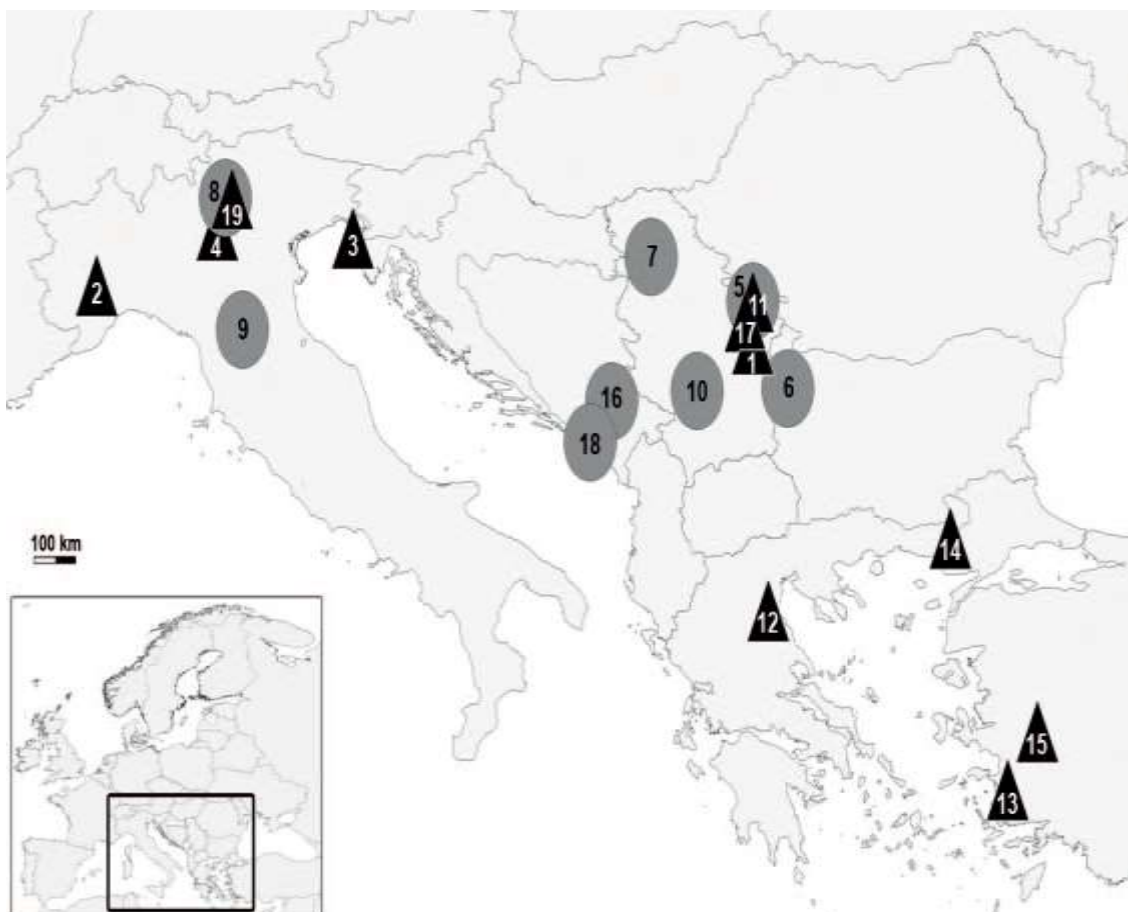
Na osnovu morfoloških karakteristika, mesta uzorkovanja i sezone uzorkovanja jedinki, taksoni ove grupe su determinisani kao: *Merodon avidus* (Rossi, 1790) (ranije *M. avidus* A, Milankov i sar., 2001), *Merodon ibericus* (Vujić, 2015) (ranije *Merodon bicolor*, Gil Collado, 1930), *Merodon moenium* (Wiedemann, 1822) (ranije *M. avidus* B, Milankov i sar., 2001) i *Merodon megavidus* (Vujić i Radenković, 2016).

Ukupan materijal za analizu alozima obuhvatio je 118 jedinki podeljenih u 19 populacija po odgovarajućim lokalitetima (Tabela 1). Ove jedinke su, preliminarno, na osnovu morfoloških karaktera, geografsko-klimatskih odlika lokaliteta i sezone aktivnosti, identifikovane kao *M. avidus* ili *M. moenium* (Slika 4). Šest populacija poticale su iz Srbije, pet iz Italije, jedna iz Hrvatske, i po dve iz Crne Gore, Grčke i Turske (Slika 5). Detaljne informacije u vezi sa navedenim materijalom nalaze se u Prilogu (Tabela 4-Prilog).

Uzorci korišćeni u DNK analizi, kao i analizi alozima su, odmah nakon prikupljanja, zamrznuti na temperaturu od -20°C i na taj način čuvani do laboratorijskih analiza.



Slika 4. Abdomen, mužjak, dorzalna strana: A-*Merodon avidus* (jesen), B-*Merodon avidus* (proleće), C-*Merodon moenium*.



Slika 5. Grafički prikaz lokaliteta uzorkovanja populacija korišćenih u genetičkim analizama alozima. ▲ – *Merodon avidus*; ● – *M. moenium*. Srbija: 1– Malinik (planinski obronci), 5 – Đerdap (zaliv), prolećna generacija, 6 – Stara Planina (planina), 7 – Fruška Gora (niska planina), 10 – Kopaonik (planina), 11 – Đerdap (zaliv), jesenja generacija, 17 – Dubašnica (planina); Crna Gora: 16 – Durmitor (planina), 18 – Orijen (planina); Italija: 2 – Piemonte Cuneo (niska planina), 4 – Brescia, jezero Garda (planinski obronci), 8 – Trento Bleggio Superiore (planina), 9 – Bologna Castiglione dei Pepoli Monte Baducco (planina), 19 – Trento Sarche (planinski obronci); Hrvatska: 3 – Umag (Jadranska obala); Grčka: 12 – Olimp (planinski obronci), 14 – Evros Dadia (planski obronci); Turska: 13 – jezero Baffa (planinski obronci Beşparmak), 15 – Bozdağ planine (niska planina).

Tabela 1. Pregled uzorkovanja jedinki po populacijama za analizu alozimske varijabilnosti

Populacija	Država	Broj jedinki	Takson
Malinik	Srbija	10	<i>M. avidus</i>
Đerdap	Srbija	6	<i>M. moenium</i>
Stara Planina	Srbija	5	<i>M. moenium</i>
Fruška Gora	Srbija	10	<i>M. moenium</i>
Kopaonik	Srbija	10	<i>M. moenium</i>
Đerdap	Srbija	5	<i>M. avidus</i>
Dubašnica	Srbija	5	<i>M. avidus</i>
Durmitor	Crna Gora	5	<i>M. moenium</i>
Orjen	Crna Gora	5	<i>M. moenium</i>
Piemonte	Italija	5	<i>M. avidus</i>
Garda, Brescia	Italija	4	<i>M. avidus</i>
Bleggio Superiore	Italija	6	<i>M. moenium</i>
Bologna, Monte Baducco	Italija	7	<i>M. moenium</i>
Trento Sarche	Italija	4	<i>M. avidus</i>
Umag	Hrvatska	10	<i>M. avidus</i>
Olimp	Grčka	5	<i>M. avidus</i>
Evros	Grčka	5	<i>M. avidus</i>
Beşparmak-Baffa	Turska	5	<i>M. avidus</i>
Bozdağ	Turska	6	<i>M. avidus</i>

U cilju analize ekološke niše modelovanjem distribucije vrsta *Merodon avidus* kompleksa analizirano je 2.135 jedinki (1.183 *Merodon avidus*, 852 *Merodon moenium*, 52 *Merodon megavidus* i 48 *Merodon ibericus*) iz Albanije, Andore, Bosne i Hercegovine, Bugarske, Hrvatske, Kipra, Danske, Francuske, republike severne Makedonije, Nemačke, Grčke, Izraela, Italije, Crne Gore, Maroka, Holandije, Rumunije, Srbije, Slovačke, Švedske, Švajcarske, Španije i Turske (Tabela 5-Prilog). Najveći broj podataka preuzet je iz baze podataka Laboratorije za istraživanje i zaštitu biodiverziteta, Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, kao i iz Centra za Biodiverzitet Naturalis (NBCN), Lajden, Holandija. Ostali korišćeni primerci su deponovani u muzejskim i univerzitetskim zbirkama i privatnim kolekcijama, navedenim na početku ovog poglavlja.

U cilju testiranja i prezentovanja primene modelovanja determinacije spornih jedinki u bazi podataka, uz pomoć neuronske mreže i GBM tehnike analizirane su 2.042 jedinke (1.183 jedinke *M. avidus* i 859 jedinki *M. moenium* (podset podataka korišćenih u modelovanju distribucije, Tabela 5-Prilog). Kako bi se testirala sposobnost predikcije na osnovu sirovih podataka, u kojima pojedine vrednosti nedostaju, ovaj uzorak je, u pojedinim etapama modelovanja, proširen na ukupno 3.490 jedinki *M. avidus* i *M. moenium*. Podaci o ovim jedinkama su preuzeti iz baze podataka, Departmana za Biologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

5.2 Metode

5.2.1 Izolacija DNK

DNK je izolovana iz nogu i abdomena jedinki upotrebom SDS protokola ekstrakcije (Chen i sar., 2010), uz manje modifikacije. Tkivo je usitnjeno u kiveti u prisustvu 500 μ l digestionog SDS pufera (0,5% (w/v) SDS, 200mM Tris, 25mM EDTA, 250mM NaCl). Simultano sa mehaničkim razaranjem tkiva, ovaj pufer omogućio je lizu ćelija i oslobađanje očuvane DNK. Kivetice sa uzorcima su inkubirane 1h na 37°C na suvom termobloku, u cilju optimizacije hemijskih uslova za razgradnju tkiva. Potom se pristupilo

dodavanju po 5µl proteinaza K rastvora koncentracije 40mg/ml u svaku kivetu, nakon čega je nastavljena inkubacija na 50°C tokom narednih sat vremena. U sledećoj fazi, dobijeni homogenat ekstrahovan je uz pomoć 240µl fenol/hloroform/izoamil-alkohola u odnosu 25:24:1, a potom centrifugiran na 12.000rpm, 10min. Ekstrakcija je ponovo izvršena sa hloroform/izoamil alkoholom (24:1), nakon čega se pristupilo DNK precipitaciji. Ona je izvršena dodavanjem 500µl hladnog, apsolutnog etanola, praćeno centrifugiranjem na 12.000rpm, 15min, na 4°C. Nastali talog je ispiran kroz dva ponavljanja, sa po 150µl 70% etanola, uz ponovno centrifugiranje na 12.000rpm tokom 3min, na 4°C. Finalni talog osušen je 30min na 37°C, a potom rastvoren u 30µl 0,1xTE pufera (pH=8).

Kvalitet i koncentracija izolovane DNK provereni su NanoDrop spektrofotometru merenjem absorbance na 280nm, 260nm i 230nm. U uzorcima kod kojih je dobijena visoka koncentracija DNK (100 ng/µl i više), pravljena su radna razblaženja od 50 ng/µl koja su korišćena u daljim analizama.

5.2.2 Umnožavanje citohrom c-oksidaža (COI) gena DNK

Nakon izolacije DNK, pristupljeno je amplifikaciji dva regiona (3'COI region i 5'COI region) citohrom c-oksidaža I gena, uz pomoć PCR reakcije. Uslovi PCR reakcije bili su isti za oba amplifikovana segmenta, uz upotrebu različitih prajmera. Za amplifikovanje 3'COI segmenta korišćeni su prajmeri C1-J-2183 (5'-CAACATTTATTTGATTT TTTGG-3') (alias JERRY) i TL2-N-3014 (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3') (alias PAT) (Simon i sar., 1994). 5' segment citohrom c-oksidaže I gena amplifikovan je uz pomoć LCO (5' GCTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') i HCO prajmera (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer i sar., 1994). PCR reakcije izvršene su u volumenu reakcije od 20 µl. Reakcionu smešu su činili: 1x Taq pufer (Thermo Scientific); 2,5mM MgCl₂; 0,1 mM svakog nukleotida; 5pM svakog prajmera; 1 U Taq DNK polimeraze (Thermo Scientific) i 50ng genomske DNK.

Amplifikacija oba mtDNK COI regiona je izvršena na Eppendorf Personal Thermocycler uređaju, a uslovi PCR reakcije bili su sledeći:

inicijalna denaturacija na 95°C	30sec	
denaturacija na 94°C	30sec	} 30x
vezivanje prajmera na 49°C	30sec	
ekstenzija na 72°C	2min	
finalna ekstenzija na 72°C	8min	

PCR produkti su provereni vizuelizacijom na 2%-nom agaroznom gelu. Agaroza je rastvorena u 1xTBE puferu, uz direktno dodavanje etidijum-bromida u smešu koji je korišćen za vizuelizaciju produkata na gelu. Elektroforeza je rađena pri konstantnoj voltaži od 100V. Dobijeni PCR produkti su zatim prečišćeni uz pomoć Exo-Sap metode, u skladu sa protokolom proizvođača (Thermo Scientific). Za svaki produkt određena je sekvenca mtDNK u jednom smeru, primenom *Forward* prajmera korišćenog za PCR amplifikaciju, na kapilarnom ABI3730xl sekvencioneru (Applied Biosystems) na Institutu za molekularnu medicinu na Univerzitetu u Helsinkiju, Finska.

5.2.3 Analiza sekvenci citohrom c-oksidaža I gena DNK

U cilju genetičke karakterizacije kompleksa vrsta *M. avidus*, kreirana su tri seta sekvenci, koja su uvrštena u dalje statističke analize. Poravnavanje sekvenci izvršeno je uz pomoć Clustal W algoritma (Tomson i sar., 1994) implementiranog u program BioEdit (Hall, 1999), a finalne modifikacije izvršene su ručno, u istom programskom okviru. Ukupan broj jedinki (sekvenci) u okviru 3' COI seta iznosio je 242 a u okviru 5' COI seta 135. Za 120 jedinki, kod kojih su bile dostupne i 3'COI i 5'COI sekvence, kreirana je ukupna COI sekvenca dužine 1.260 nukleotida, dobijena pripajanjem 5'COI sekvence na 3'COI sekvencu, za svaku pojedinačnu jedinku. Jedinke su, na osnovu morfologije, lokaliteta uzorkovanja, kao i sezone uzorkovanja, preliminarno determinisane kao *M. avidus*, *M. moenium*, *M. hikmeti*, *M. megavidus* ili *M. ibericus*. Detaljnije informacije u vezi sa navedenim materijalom nalaze se u Prilogu (Tabela 1, 2, 3-Prilog). Kreiranje

ukupnih COI sekvenci izvršeno je u programskom paketu MEGA verzija 7 (Kumar i sar., 2015). Konačna dužina nukleotidnih sekvenci iznosila je 650 nukleotida za 3'COI region i 5' COI region i 1.260 nukleotida za set sekvenci sastavljen od spojenih 3' i 5' COI regiona. Osnovni parametri DNK varijabilnosti (broj polimorfnih mesta, broj haplotipova, h-diverzitet haplotipova, π -diverzitet nukleotida, k-prosečan broj razlika po parovima), kao i frekvencije haplotipova, izračunati su u okviru programskog paketa DnaSP verzija 6 (Rozas i sar., 2017).

COI barkod sekvence grupisane su uporebom Neighbour-joining (NJ) analize, analize maksimalne verovanoće (Maximum-likelihood, ML) i maksimalne parsimonije (Maximum Parsimony, MP). Sekvenca *Eumerus sulcitibius* Rondani, 1868 (broj u Gen banci KT157587) korišćena je kao outgrupa u svim filogenetičkim analizama. U programskom paketu MEGA izvršena je procena najboljeg modela bazne substitucije, po kojoj je, za 3'COI i 5' COI setove sekvenci, Tamura-3 model nukleotidne susbstitucije (T92) označen kao prvi najbolji, a Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) kao drugi najbolji model (oba modela sa Gama korekcijom za varijacije između pozicija u stopama substitucije). Na setu sačinjenom od spojenih 3' i 5' sekvenci, HKY model sa Gama korekcijom procenjen je kao prvi najbolji, a T92 sa Gama korekcijom kao drugi najbolji substitucioni model. U okviru istog programa, korišćenjem odgovajućeg modela nukleotidne substitucije, kreirani su NJ i ML dendrogrami. Bootstrap vrednosti su izračunate za svako stablo, kroz 1.000 replikacija. Sve bazne pozicije tretirane su kao karakteri od podjednakog značaja.

Analizom maksimalne parsimonije, baziranoj na postizanju minimalnog broja nukleotidnih promena u okviru prezentovanog filogenetičkog stabla, tri seta sekvenci analizirana su uz pomoć programskog paketa TNT 1.1. (Goloboff i sar., 2008). Navedeni program kreiran je sa ciljem da omogući efikasnu primenu navedene metode na velikom broju nukleotidnih sekvenci. Analiza je izvršena kroz 1.000 replikacija, uz 10 zadržanih stabala po replikaciji, 10.000 stabala u memoriji i TBR algoritma zamene (engl. *tree bisection and reconnection swapping algorithm*, TBR). Kreiranje konsenzus filogenetičkog stabla i vizuelizacija nukleotidnih promena izvršena je u programu WinClada 1.00.08 (Nixon, 2002).

Filogenetičke analize urađene su i primenom Bajesove statistike, u programu Mr. Bayes ver. 3.2. (Ronquist i sar., 2012). Umesto sekvenci svih pojedinačnih jedinki, u Bajesovu analizu uvrštene su sekvence haplotipova, prethodno determinisane u programu DnaSP.

Kao *a priori* informacija korišćen je HKY model bazne substitucije sa Gama korekcijom za varijacije između pozicija u stopama substitucije. Parametri analize u programu Mr Bayes bili su sledeći: rađeno je dva ponavljanja za četiri Markov Chain Monte Carlo (MCMC) permutacije (jedan hladan i tri topla MCMC lanca), 3.000.000 iteracija, uz beleženje logaritamskih vrednosti za svakih 100 iteracija. Za sumiranje rezultata analize i provere da li je li je dužina analize i *burn-in* perioda bila dovoljna za stabilizaciju logaritma korišćen je program Tracer v.1.5. (Rambaut i Drummond, 2007). Prvih 25% iteracija odbačeno je kao burn-in period, a 50% konsenzus stabla konstruisana su u programu FigTree v1.4.0. (Raumbaut, 2009).

Analiza molekularne varijanse (AMOVA) u okviru i između pretpostavljenih vrsta *Merodon avidus* kompleksa, izvršena je upotrebom programa Arlequin 3.5.2.2. (Excoffier i Lischer, 2010). U istom programskog okviru, na osnovu genetičkih udaljenosti determinisanih haplotipova, izračunate su odgovarajuće Φ_{st} vrednosti.

5.2.4 Analiza varijabilnosti enzimskih lokusa

Genetička varijabilnost enzima proučavana je upotrebom standardne elektroforeze na 5%-nom poliakrilamidnom gelu (po Milankov i sar., 2001). Set od pet, prethodno ustanovljenih dijagnostičkih enzima za kompleks vrsta *Merodon avidus* (Milankov et al., 2001) je odabran za analizu: malični enzim (ME, 1.1.1.4), izocitrat-dehidrogenaza (IDH, 1.1.1.42; *Idh-2*), α -glicerofosfat-dehidrogenaza (GPD, 1.1.1.8; *Gpd-2*), aspartat-amino-transferaza (AAT; 2.6.1.1) i glukozofosfat-izomeraza (GPI, 5.3.1.9). Kako bi bilo moguće direktno poređenje rezultata za različite populacije i taksone, kombinovani uzorci iz različitih populacija lodirani su na gel, pre elektroforeze. U zavisnosti od različite metaboličke funkcije i distribucije enzima u telu insekata, za analizu enzimske varijabilnosti korišćeni su različiti telesni regioni (glava: AAT, GPI, ME; toraks: GPD, IDH). U zavisnosti od enzima, elektroforeza je tekla u različitim puferskim sistemima-Tris-citrat ili Tris-borat EDTA pufere (Tabela 2). Pri konstantnoj jačini struje od 180V (za TBE pufere), odnosno, konstantnom naponu od 40mA (TC pufere), elektroforeza je trajala, u proseku, 3h. Nakon isticanja uzoraka pristupilo se bojenju gelova, u cilju vizuelizacije hemijske aktivnosti enzima. Osnova protokola za bojenje preuzeta je iz Milankov i sar. (2001), uz izvršene izmene u količini reagenasa i ukupnom volumenu reakcije.

Histohemijsko bojenje podrazumevalo je izazivanje odgovarajuće metaboličke reakcije, dodavanjem odgovarajućeg supstrata, pufera, kofaktora i boje, za svaki enzim, na sledeći način:

Aspartat-amino-transferaza (AAT)

pufer 0,2M Tric HCL pH 8,0 (50ml)

supstrat α -ketoglutarina kiselina (100mg), L-aspartanska kiselina (200mg)

kofaktor piridoksal-5-fosfat (30mg)

boja Fast-blue BB (100mg)

Malični enzim (ME)

pufer 1M Tris Hcl pH 8,5 (10ml)

supstrat malična kiselina (50mg)

kofaktor NADP (15mg)

1M MgCl₂ (2,5 ml)

boja NBT (1ml)

PMS (0,2 ml)

Razblaživanje: dH₂O do 50 ml

α -glicerofosfat-dehidrogenaza (GPD)

pufer 1M Tris-Hcl ph 8,0 (8 ml)

dH₂O (32ml)

supstrat β - glicerofosfat (500mg)

kofaktor 0,1M MgCl₂ (1ml)

boja NAD (2ml)

NBT (1,3ml)

PMS (0,5ml)

Izocitrat-dehidrogenaza (IDH)

pufer 1M Tris-Hcl ph 8,0 (6 ml)

dH₂O (24ml)

supstrat D,L-Izocitratna kiselina (50mg)

kofaktor NADP (1ml)

0,1M MgCl₂ (3ml)

boja NBT (0,5ml)

PMS (0,2ml)

Razblaživanje: dH₂O do 24 ml

glukozofosfat-izomeraza (GPI)

pufer 1M Tris Hcl ph 7,1 (2,5ml)

supstrat fruktoza-6-fosfat (40mg)

kofaktor NADP (1ml)

0,1M MgCl₂ (2,5ml)

enzim glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza (5μl)

boja NBT-R (0,75ml)

PMS (0,5ml)

Razblaživanje: dH₂O do 60 ml

Gelovi su, tokom bojenja, inkubirani na 37°C do pojavljivanja traka (bendova), nakon čega se pristupilo očitavanju dobijenih slika (zimograma). Aleli su bili obeleženi oznakama od „a” do „c”, u zavisnosti od razdaljine koju su prešli u toku elektroforeze, pri čemu je „a” bio alel koji je prešao najkraći put na gelu. Važno je istaći da ovakav način obeležavanja nije komplementaran ranijoj analizi istih enzima (Milankov i sar., 2001), kada su druge oznake bile korišćene. Genotipovi i frekvencije alela izračunate su na osnovu očitavanja bendova i genetičke interpretacije zimograma. Statistička analiza alozimskih podataka izvršena je uz pomoć kompjuterskog programa POPGENE, verzija 1.32 (Yeh i sar., 1999). Tom prilikom, izračunati su sledeći parametri: frekvencije alela, broj alela, polimorfni lokusi, očekivana i uočena heterozigotnost, χ^2 test devijacije od Hardy-Vajnbergove ravnoteže, parametri F statistike, genetička bliskost i udaljenost (Nei, 1978). Konstruisan je UPGMA dendrogram, baziran na vrednostima genetičke udaljenosti. Kako bi se izvršilo testiranje značajnosti razlika u frekvencijama alela između morfološki preliminarno definisanih vrsta *M. avidus* i *M. moenium*, korišćen je programski paket Statistica 10 (StatSoft, 2011). Korelacija između genetičkih i geografskih disanci testirana je Mantelovim neparametrijskim testom, na matricama udaljenosti po parovima (Mantel, 1967). Ovo je urađeno MANTEL pristupom u okviru programa IBD verzija 3.23 (Jensen i sar., 2005).

Tabela 2. Enzimi, telesni regioni i puferski sistemi korišćeni u analizi

Naziv enzima	Lokus	Telesni region	Puferski sistem
malični enzim (ME)	Me	Glava	TBE
izocitrat-dehidrogenaza (IDH)	Idh-2	Grudi	TC
α -glicerofosfat-dehidrogenaza (GPD)	Gpd-2	Grudi	TC
aspartat-amino-transferaza (AAT)	Aat	Glava	TC
glukozofosfat-izomeraza (GPI)	Gpi	Glava	TBE

TC pufer-1M Tris-citrat pufer; pH=7,1

TBE pufer-1M Tris-borat-EDTA, pH=8,9

5.2.5 Modelovanje sadašnje distribucije u okviru *Merodon avidus* kompleksa

Projekcije niša modelovanjem sadašnje distribucije urađene su u programskom paketu MAXENT 3.4. (Phillips i sar., 2008), pri standardnim parametrima modela (*convergence threshold*: 0,00001; maksimalan broj iteracija: 500, vrednost regularizacije:auto). Geografske koordinate njihove distribucije korišćene su kao ulazna komponenta analize, bez modifikacije. Kod podataka o prisutnosti za koje nisu postojale koordinate u bazi, iste su zabeležene upotrebom Google Earth programa (Google Inc., 2013), koji je, po potrebi, korišćen i za proveru i validaciju već dokumentovanih koordinata. Lokaliteti su predstavljeni u programskom paketu ModestR (García-Roselló i sar., 2013), u kome su napravljene odgovarajuće mape distribucije (Slika 6 a,b,c,d).

a)



b)



c)



d)



Slika 6. Mapa distribucije taksona *M. avidus* (a), *M. moenium* (b), *M. ibericus* (c) i *M. megavidus* (d)

Ukupno 19 bioklimatskih varijabli (2,5 arc-min rezolucije), biološki značajnih u definiciji ekoloških i fizioloških tolerancija jedne vrste (Graham i Hijmans 2006., Muriene i sar., 2009) kreirano je na osnovu baze podataka World Clim (Hijmans i sar., 2005., www.worldclim.org), u kojoj su interpolirani klimatski podaci svetskih meteoroloških stanica. Tehnička priprema klimatskih varijabli za njihovo unošenje i dalju analizu, urađena je geoinformacionim alatom ArcMap (verzija 10.5.1), u okviru ArcGis platforme (ESRI, 2014).

U programskom paketu ENMTools (Warren i sar., 2010) testirana je korelacija između 19 bioklimatskih varijabli, pri čemu je kreirana Pirsonova korelaciona matrica. Vrednost Pirsonovog koeficijenta $r \geq 0,75$ ukazala je na visoku korelaciju između pojedinih varijabli i dovela do selektivne eliminacije suvišnih varijabli iz dalje analize. Finalni set klimatskih podataka odabran za modelovanje distribucije obuhvatio je sledećih 9 varijabli: Bio2, Bio8, Bio11, Bio13, Bio14, Bio15, Bio17, Bio 18 i Bio 19 (Tabela 3).

Tabela 3. Klimatske varijable korišćene u modelovanju distribucije vrsta *Merodon avidus* kompleksa

Oznaka varijable	Opis
bio2	Srednja vrednost temperaturnog gradijenta [Sr. vrednost (max temp – min temp)]
bio8	Prosečna temperatura u najvlažnijem kvartalu
bio9	Prosečna temperatura u najsuvljem kvartalu
bio11	Prosečna temperatura u najhladnijem kvartalu
bio13	Precipitacija u najvlažnijem mesecu
bio14	Precipitacija u najsuvljem mesecu
bio15	Sezonska precipitacija (koeficijent varijacije)
bio17	Precipitacija u najsuvljem kvartalu
bio18	Precipitacija u najtoplijem kvartalu
bio19	Precipitacija u najhladnijem kvartalu

Kako bi se omogućila statistička procena prediktivne sposobnosti kreiranog Maxent modela, podaci o prisutnosti jedinki *M. avidus* kompleksa podeljeni su, od strane samog Maxent programa, na trening podatke (75% uzorka) i test podatke (25% uzorka). Kako bi se dobili što precizniji rezultati, analiza je unapređena upotrebom bias fajla, kreiranog uz pomoć ArcMap alata. Bias fajl predstavlja set pozadinskih tačaka za svaku od analiziranih vrsta, kreiran u cilju eliminisanja potencijalne greške u modelovanju, koja može nastati ukoliko tačke prisustva nisu uzorkovane dovoljno nasumično. Maxent analiza rezultovala je kontinualnom predikcijom distribucije za svaku vrstu unutar *M. avidus* kompleksa (predikcija verovatnoće u intervalu od 0 do 1), koja je vizualizovana kroz potencijalne mape distribucije. *Convergence threshold* vrednošću definisan je prag za postizanje zadovoljavajućeg modela predikcije-za predikciju verovatnoće pojavljivanja vrste na određenoj tački korišćen je onaj model, koji je, treniranjem i proverom na trening i test

podacima, pokazao da verovatnoća greške iznosi 0,001% (verovatnoća da se predvidi odsustvo u tački gde je vrsta prisutna). Po završetku Maxent analize, u cilju dobijanja finalnog grafičkog prikaza distribucije vrsta, definisan je prag verovatnoće njihovog prisustva. Za svaku pojedinačnu vrstu, odabran je threshold „10% *minimum training presence*”, po kome (da bi se vrsta, u datoj tački, smatrala potencijalno prisutnom) minimalan broj predviđeno prisutnih jedinki iznosi 10% od trening uzorka. Na taj način, u svim tačkama Maxent projekcija, koje su se nalazile iznad definisanog praga, predviđeno je prisustvo analiziranih vrsta, sa određenim stepenom verovatnoće.

Statistička validacija modela kreiranog u Maxentu omogućena je AUC testom u okviru same Maxent analize, kao i binominalnim testom. AUC test podrazumeva računanje AUC vrednosti i analizu ROC krive (engl. *receiver operating characteristic curve*), koja je grafički prikaz odnosa senzitivnosti (procenat korektno procenjenih tačaka prisustva) i specifičnosti (procenat korektno procenjenih tačaka odsustva) pri različitim kriterijuma prisutnosti (engl. *threshold*). Prediktivna sposobnost modela korišćenog u analizi je utoliko bolja, ukoliko je veća površina ispod krive (engl. *area under curve*-AUC), odnosno, što više ROC kriva prati y osu i gornji deo grafika (Phillips, 2006). Binominalnim testom izračunata je stopa greške (engl. *omission rate*), koja je obrnuto proporcionalna vrednosti senzitivnosti (Pearson, 2010). Takođe je testirana nulta hipoteza da predikcija test tačaka nije bolja od nasumične predikcije na istom području.

Kako bi se utvrdila sličnost predikcija pogodnosti staništa između parova populacija, urađen je test preklapanja niša u alatu ENMTools (Warren i sar., 2010). Ulazni podatak ove analize predstavljale su projekcije niša (mape distribucije) dobijene Maxent-om, koje su, primenom praga od 10% prisustva trening podataka, prevedene u binarni oblik. Na taj način, umesto inicijalno dobijene verovatnoće prisustva jedinki za svaku tačku, u svakoj tački rešetke, vrsta je prikazana kao „prisutna” ili „odsutna”. Preklapanje tako obrađenih mapa procenjeno je preko Šonerovog D indeksa (Schoener, 1968). D vrednosti kreću se u intervalu od 0 (ne postoji nikakvo preklapanje) do 1 (kompletno preklapanje). U istom alatu urađen je i test identičnosti niša (engl. *the niche identity test*), kao i test njihove sličnosti (engl. *background test*). Test identičnosti je konzervativan pristup, pri kome se identičnost dve vrste očekuje samo u slučaju tolerancije potpuno istog seta ekoloških uslova i prisustva ovakvih uslova oko njih. Test sličnosti niša, sa druge strane, procenjuje da li su dve vrste manje ili više slične nego što bi, slučajnošću, bilo očekivano, uzimajući pri tome u obzir ekološke razlike sredina u kojima se nalaze. Ovo je omogućeno

upotrebom background fajla, kreiranog za svaku analiziranu vrstu, uz pomoć alata ArcMap. Test sličnosti vrsta urađen je u oba smera, za svaki par vrsta, pri čemu različiti smerovi mogu prikazati drugačiji rezultat. U testovima identičnosti i sličnosti, uočena D vrednost preklapanja niša poređena je, za svaki par taksona, sa nultom distribucijom (100 replikacija). Nulta distribucija je kreirana spajanjem podataka o prisutnosti oba taksona, randomizacijom lokaliteta, te kreiranjem dva nova uzorka iste veličine kao originalni, bez razmatranja sličnosti ili različitosti staništa. Nulta hipoteza o identičnosti/sličnosti niša se odbija, ukoliko je prva D vrednost (uočeno preklapanje niša) statistički značajno ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$) različita od vrednosti koja se očekuje na osnovu seta pseudoreplikata nulte distribucije (Warren i sar., 2010).

5.2.6 Određivanje taksonomske pripadnosti jedinki pomoću tehnika neuronskih mreža i bustinga regresionih stabala

Za treniranje odgovarajućeg modela i postizanje njegove maksimalne sposobnosti da vrši tačnu determinaciju jedinki, korišćeni su poznati podaci o taksonomskoj pripadnosti svake jedinke, zajedno sa njenom pratećom varijablom- geografskom širinom i dužinom lokaliteta uzorkovanja (Model 1) i danom, mesecom i godinom uzorkovanja (Model 2). S obzirom na to da je priprema podataka najznačajniji korak u svim ML algoritmima, posebna pažnja posvećena je upravo navedenom koraku. U modelovanju taksonomske pripadnosti jedinki pomoću GBM metode, svaki od navedenih modela projektovan je kroz različite varijante podataka: kroz sirove podatke (svih 3.490 jedinki), kroz skraćenu bazu podataka (u kojoj su izbisani svi ulazni podaci kod kojih je neka vrednost nedostajala), kao i kroz sirovu bazu popunjenu surogatnim podacima (nepoznati podaci za pojedine jedinke se, algoritmom veštačke inteligencije, predviđaju i automatski popunjavaju, na osnovu svih ostalih dostupnih podataka u bazi). Za razliku od GBM okvira, koji prevazilazi odsutne informacije implicitnom konverzijom podataka, neuronska mreža nije sposobna za rad sa potpuno sirovim podacima. Modelovanje taksonomske pripadnosti jedinki neuronskom mrežom je, iz tog razloga, vršeno kroz dve varijante podataka: kroz skraćenu bazu podataka (svedenu na one ulazne podatke za koje su bile poznate obe varijable od interesa), kao i kroz 3.490 podataka, popunjenih surogatnim podacima, njihovom automatskom predikcijom.

Svaka od osmišljenih varijanti modelovanja, definisana kroz pripremu podataka i izbor varijable u odnosu na koju se vršila predikcija, implementirana je u odgovarajuću platformu veštačke inteligencije. Rezultat je iskazan brojčanom vrednošću, kroz koju je bilo moguće proceniti i uporediti uspešnost svakog kreiranog modela predikcije.

Za izradu modela korišćen je programski alat R-Studio i programski jezik R (dostupan na www.rstudio.com). Modelovanje je vršeno uz pomoć različitih postojećih biblioteka R-Studio-a. Tako je za programiranje modela neuronske mreže korišćena pomoć biblioteke „Neuralnet” (<https://cran.r-project.org/web/packages/neuralnet/neuralnet.pdf>), dok je gbm programirana uz pomoć biblioteke istog naziva („gbm”) (<https://cran.r-project.org/web/packages/gbm/gbm.pdf>). Korišćena je neuronska mreža BPN tipa, sa 10 skrivenih slojeva. U okviru GBM tehnike korišćena je Bernulijeva distribucija, a broj stabala programiran je na 2.500. Deo koda korišćenog za programiranje nalazi se u Prilogu (Slika 6 i 7-Prilog).

Upotreba dve različite varijable (geografska ili vremenska) u pravljenju modela determinacije imala je za cilj komparaciju uspešnosti Modela 1 i Modela 2 u okviru svake od navedenih tehnika, kroz sve varijante pripremljenih podataka, kao i izvođenje zaključaka o njihovoj budućoj primenjivosti u determinaciji uzoraka kod kojih nije moguće izvršiti sigurnu taksonomsku identifikaciju.

6. REZULTATI

Višegodišnja terenska istraživanja ukazala su na to da jedinke vrste *M. moenium*, generalno, naseljavaju područja sa nižim prosečnim temperaturama u odnosu na jedinke *M. avidus*. Istovremeno, pronađeni su lokaliteti na kojima oba taksona egzistiraju u simpatriji. Za ovakve lokalitete pretpostavljeno je da je aktivnost adultnih populacija uslovljena sezonskim promenama-dosadašnji rezultati ukazuju na prisustvo temporalne divergencije na kontinentalnim staništima, pri čemu se vrsta *M. moenium* pojavljuje u hladnijem periodu sezone, sa ranijom pojavom adultnih jedinki u odnosu na vrstu *M. avidus*. Ovakva hipoteza je potkrepljena i činjenicom da nijedan primerak vrste *M. moenium* nije pronađen nakon jula meseca, ni na jednom od lokaliteta. Stoga je pretpostavljeno da bi, u slučajevima simpatrije *avidusa* i *moeniuma*, prolećna generacija mogla pripadati taksonu *M. moenium*, a letnja ili jesenja taksonu *M. avidus*. Ovakva premisa bila je u skladu i sa određenim morfološkim indicijama. Morfološka analiza je pokazala da su jedinke *M. avidus* morfološki varijabilne, pri čemu je prolećna generacija vrste *M. avidus*-a morfološki sličnija vrsti *M. moenium* od jesenje generacije istog taksona (Slika 4). Prisustvo više generacija u okviru jedne vrste predstavlja retkost za rod *Merodon*, i do sada nije primećeno kod taksona *M. moenium*, koji se odlikuje postojanjem samo jedne generacije. Pretpostavka ovog istraživanja je da bi pojedini ekološki uslovi mogli doprineti postojanju sezonski uslovljenih fenotipova, kao i da bi mogli biti povezani sa samim genetičkim razdvajanjem u okviru *M. avidus* kompleksa.

Najnovija terenska istraživanja otkrila su i prisustvo dva lokaliteta na kojima se jedinke vrste *M. avidus* i *M. moenium* sreću zajedno, na istom lokalitetu i u istom vremenskom trenutku, sa izraženim preferencijama ka različitim mikrostaništima-dok su adulti *M. avidusa* bili prisutni na sunčanom delu livadske površine, jedinke *M. moeniuma* uzorkovane su u senovitom području iste (Vujić, usmeno). Ova pojava zabeležena je na dva mediteranska ostrva- na Korzici (Francuska) i na Krfu (Grčka), te je prva pretpostavka bila da je navedeni fenomen posledica klimatsko-geografskog efekta ostrva, kao i njihove geološke istorije. Otkriće simpatrijskih jedinki *Merodon avidus* kompleksa, sa temporalnim preklapanjem, skrenulo je pažnju na ostrvske lokalitete i otvorilo nova pitanja u daljem rasvetljavanju njihovih ekoloških i genetičkih karaktersitika. U cilju genetičke karakterizacije populacija *M. moenium* sa Korzike i Krfa, jedinke navedenih populacija

uvršteno su u DNK analizu ovog istraživanja. Pored toga, planinske populacije sličnih morfoloških odlika uzorkovane na su i na grčkim ostrvima Peloponez i Evia, te uključene u sve genetičke analize.

U cilju sticanja novog i detaljnijeg uvida u veze između populacija ispitivanog kompleksa vrsta, ovo istraživanje obuhvatilo je veći broj tehnika u odnosu na prethodna istraživanja, kao i značajno veći broj geografskih područja na kojima su jedinke uzorkovane. Takođe, polazeći od pojave više generacija u okviru jedne vrste, vršeno je i sezonsko sakupljanje različitih generacija adultnih jedinki *M.avidus*, na istom lokalitetu.

Značajan aspekt ove disertacije bilo je i rešavanje pitanje taksona *Merodon hikmeti* (Hurkmans i Hayat, 1997), koje je razjašnjeno kroz preliminarne analize ovog istraživanja. Dobijeni filogenetički rezultati, kao i rezultati Φ statistike (detaljnije navedeni u poglavlju 7. Diskusija), pokazali su da takson *M. hikmeti*, čiji holotip potiče sa visokih planina istočne Turske, ne predstavlja posebnu vrstu u okviru *M. avidus* kompleksa. S obzirom na morfološke i ekološke odlike dokumentovanog holotipa, koje odgovaraju vrsti *M. moenium*, preliminarni rezultati ove disertacije sugerisali su da naziv *M. hikmeti* ubuduće treba smatrati sinonimom *M. moenium*-a. U skladu sa ovom premisom, sve jedinke iz materijala korišćenog u ovoj disertaciji, pri uzorkovanju označene kao potencijalni *M. hikmeti* takson, finalno su determinisane kao *M. avidus* ili *M. moenium*.

6.1 Analiza DNK sekvenci mitohondrijalnog COI gena

6.1.1 Analiza 3' regiona COI gena

U uzorku od 242 jedinke *M. avidus* kompleksa utvrđeno je prisustvo 87 mtDNK haplotipa za 3' kraj COI gena. U prvoj fazi istraživanja, jedinke su, pomoću morfologije, lokaliteta i sezone uzorkovanja, determinisane kao *M. avidus*, *M. moenium*, *M. megavidus* i *M. ibericus*. Međutim, rezultati prvih genetičkih analiza doveli su do pretpostavke da je reč o novom, genetički nezavisnom taksonu. Iz tog razloga, 7 jedinki sa ostrva Krf, morfološki okarakterisanih kao *M. moenium*, označeno je kao *M. aff. moenium*. Iste filogenetičke analize ukazale su na to da još 2 jedinke sa planinskih područja poluostrva Peloponez i 1 jedinka sa planinskih područja grčkog ostrva Evia delimično dele haplotipove sa populacijom sa Krfa i bivaju sistematski grupisane u isti klaster, nezavisno od drugih vrsta *M. avidus* kompleksa. Sa ciljem da se potvrdi postojanje potencijalno nove vrste u okviru analiziranog kompleksa, za svaki od tri seta sekvenci (3'COI, 5'COI i ukupan set), navedenih 10 jedinki uvršteno je u konačne analize ove disertacije pod zajedničkim imenom *M. aff. moenium*.

Haplotipovi 3'COI regiona su definisani na osnovu 104 varijabilne pozicije, od kojih je 47 mesta označeno kao singltoni, dok je 57 mesta bilo informativno sa aspekta parsimonije. Diverzitet haplotipova za ukupan set sekvenci iznosio je $Hd=0,904$ diverzitet nukleoida $\pi=0,013$, a prosečan broj nukleotidnih razlika $k=8,273$.

Ukupno 36 haplotipova registrovano je samo u okviru vrste *M. avidus*, 28 u okviru vrste *M. moenium*, 13 u okviru vrste *M. ibericus*, 3 u okviru taksona *M. aff. moenium* i 1 u okviru vrste *M. megavidus*. U okviru taksona *M. aff. moenium*, kod jedinki sa ostrva Evia i poluostrva Peloponez zabeležen je isti haplotip Hap 2, kao i kod jedinki *M. aff. moenium* sa ostrva Krf. Za vrste *M. avidus* i *M. moenium* bilo je prisutno 6 zajedničkih haplotipova (Tabela 4; Tabela 1-Prilog).

Tabela 4. Haplotipovi 3'COI regiona mtDNK i njihova zastupljenost u okviru *M. avidus* kompleksa

Haplotip	frekvencija (broj pojavljivanja u ukupnom uzorku)	vrste kod kojih je utvrđen
Hap 1	1	<i>M. aff. moenium</i>
Hap 2	8	<i>M. aff. moenium</i>
Hap 3	1	<i>M. aff. moenium</i>
Hap 4	2	<i>M. avidus</i>
Hap 5	7	<i>M. avidus</i>
Hap 6	1	<i>M. avidus</i>
Hap 7	42	<i>M. avidus, M. moenium</i>
Hap 8	1	<i>M. avidus</i>
Hap 9	60	<i>M. avidus, M. moenium</i>
Hap 10	1	<i>M. avidus</i>
Hap 11	1	<i>M. avidus</i>
Hap 12	1	<i>M. avidus</i>
Hap 13	4	<i>M. avidus, M. moenium</i>
Hap 14	1	<i>M. avidus</i>
Hap 15	1	<i>M. avidus</i>
Hap 16	6	<i>M. avidus, M. moenium</i>
Hap 17	1	<i>M. avidus</i>
Hap 18	1	<i>M. avidus</i>
Hap 19	6	<i>M. avidus</i>
Hap 20	1	<i>M. avidus</i>
Hap 21	1	<i>M. avidus</i>
Hap 22	1	<i>M. avidus</i>
Hap 23	1	<i>M. avidus</i>
Hap 24	1	<i>M. avidus</i>
Hap 25	1	<i>M. avidus</i>
Hap 26	1	<i>M. avidus</i>
Hap 27	10	<i>M. avidus, M. moenium</i>
Hap 28	1	<i>M. avidus</i>
Hap 29	1	<i>M. avidus</i>
Hap 30	2	<i>M. avidus</i>
Hap 31	4	<i>M. avidus</i>
Hap 32	1	<i>M. avidus</i>
Hap 33	1	<i>M. avidus</i>
Hap 34	1	<i>M. avidus</i>
Hap 35	1	<i>M. avidus</i>
Hap 36	1	<i>M. avidus</i>
Hap 37	1	<i>M. avidus</i>
Hap 38	1	<i>M. avidus</i>

Hap 39	1	<i>M. avidus</i>
Hap 40	1	<i>M. avidus</i>
Hap 41	1	<i>M. avidus</i>
Hap 42	2	<i>M. avidus, M. moenium</i>
Hap 43	1	<i>M. avidus</i>
Hap 44	1	<i>M. avidus</i>
Hap 45	5	<i>M. ibericus</i>
Hap 46	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 47	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 48	2	<i>M. ibericus</i>
Hap 49	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 50	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 51	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 52	2	<i>M. ibericus</i>
Hap 53	2	<i>M. ibericus</i>
Hap 54	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 55	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 56	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 57	3	<i>M. megavidus</i>
Hap 58	2	<i>M. moenium</i>
Hap 59	2	<i>M. moenium</i>
Hap 60	1	<i>M. moenium</i>
Hap 61	2	<i>M. moenium</i>
Hap 62	1	<i>M. moenium</i>
Hap 63	1	<i>M. moenium</i>
Hap 64	3	<i>M. moenium</i>
Hap 65	1	<i>M. moenium</i>
Hap 66	1	<i>M. moenium</i>
Hap 67	1	<i>M. moenium</i>
Hap 68	1	<i>M. moenium</i>
Hap 69	1	<i>M. moenium</i>
Hap 70	1	<i>M. moenium</i>
Hap 71	1	<i>M. moenium</i>
Hap 72	1	<i>M. moenium</i>
Hap 73	1	<i>M. moenium</i>
Hap 74	1	<i>M. moenium</i>
Hap 75	1	<i>M. moenium</i>
Hap 76	1	<i>M. moenium</i>
Hap 77	1	<i>M. moenium</i>
Hap 78	1	<i>M. moenium</i>
Hap 79	1	<i>M. moenium</i>
Hap 80	1	<i>M. moenium</i>
Hap 81	1	<i>M. moenium</i>
Hap 82	1	<i>M. moenium</i>
Hap 83	1	<i>M. moenium</i>

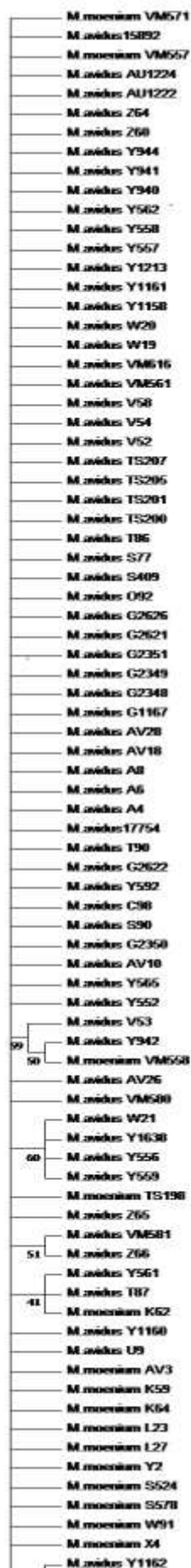
Hap 84	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 85	1	<i>M. avidus</i>
Hap 86	1	<i>M. moenium</i>
Hap 87	1	<i>M. moenium</i>

Sve filogenetičke analize sekvenci 3' regiona COI gena mtDNK rezultovale su sličnom toploškom slikom, u kojoj su se izdvojila tri klastera: *M. ibericus*, *M. megavidus* i *M. aff. moenium*, dok su preostali klasteri grupisali zajedno sekvence vrsta *M. avidus* i *M. moenium* (Slike 7 i 8). Bajesovo filogenetičko stablo haplotipova takođe je grupisalo haplotipove koji pripadaju vrsti *M. ibericus* i taksonu *M. aff. moenium* u zasebne klastere, uz odsustvo razdvajanja haplotipova vrsta *M. avidus* i *M. moenium* (Slika 9).

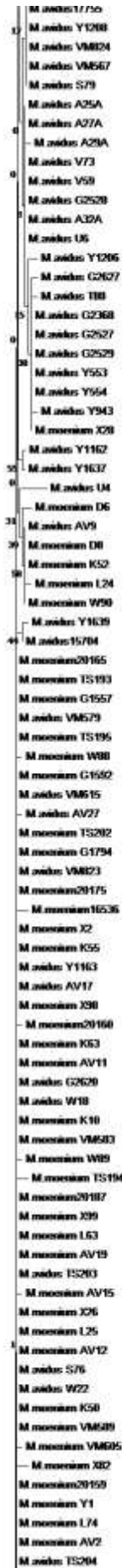
A



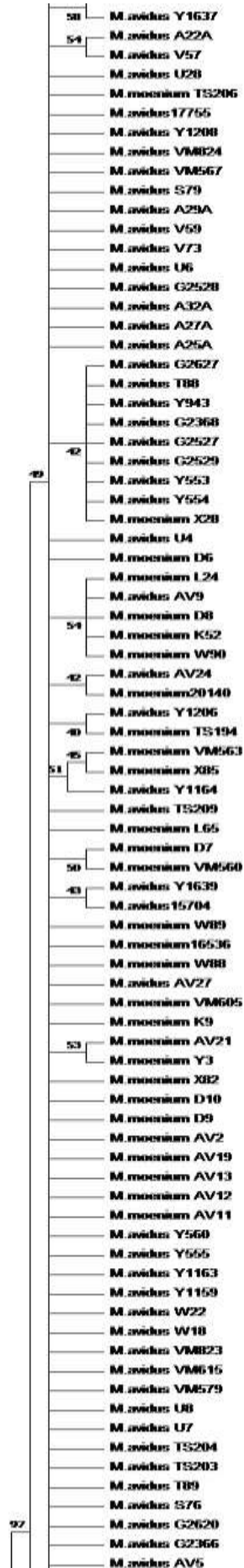
B



A

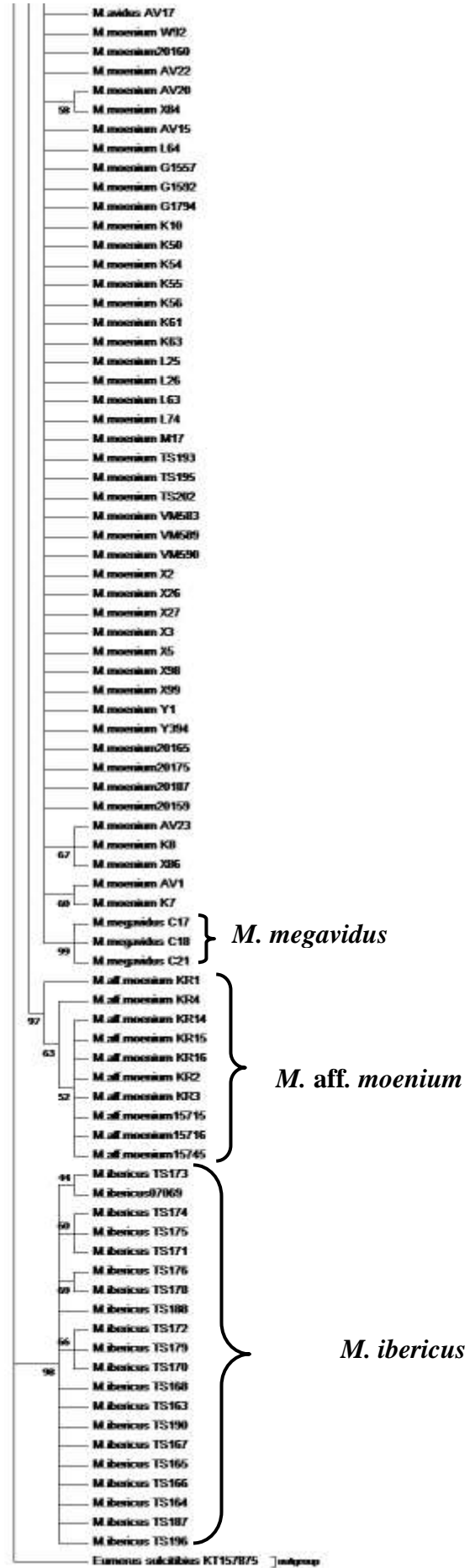
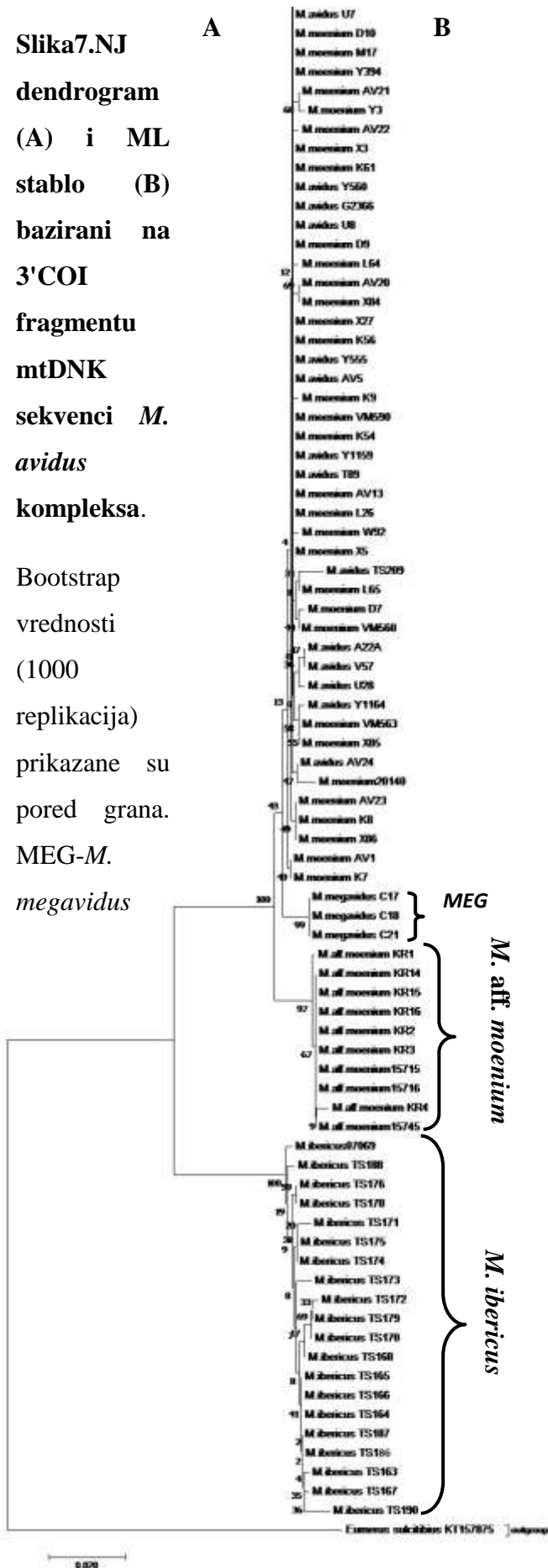


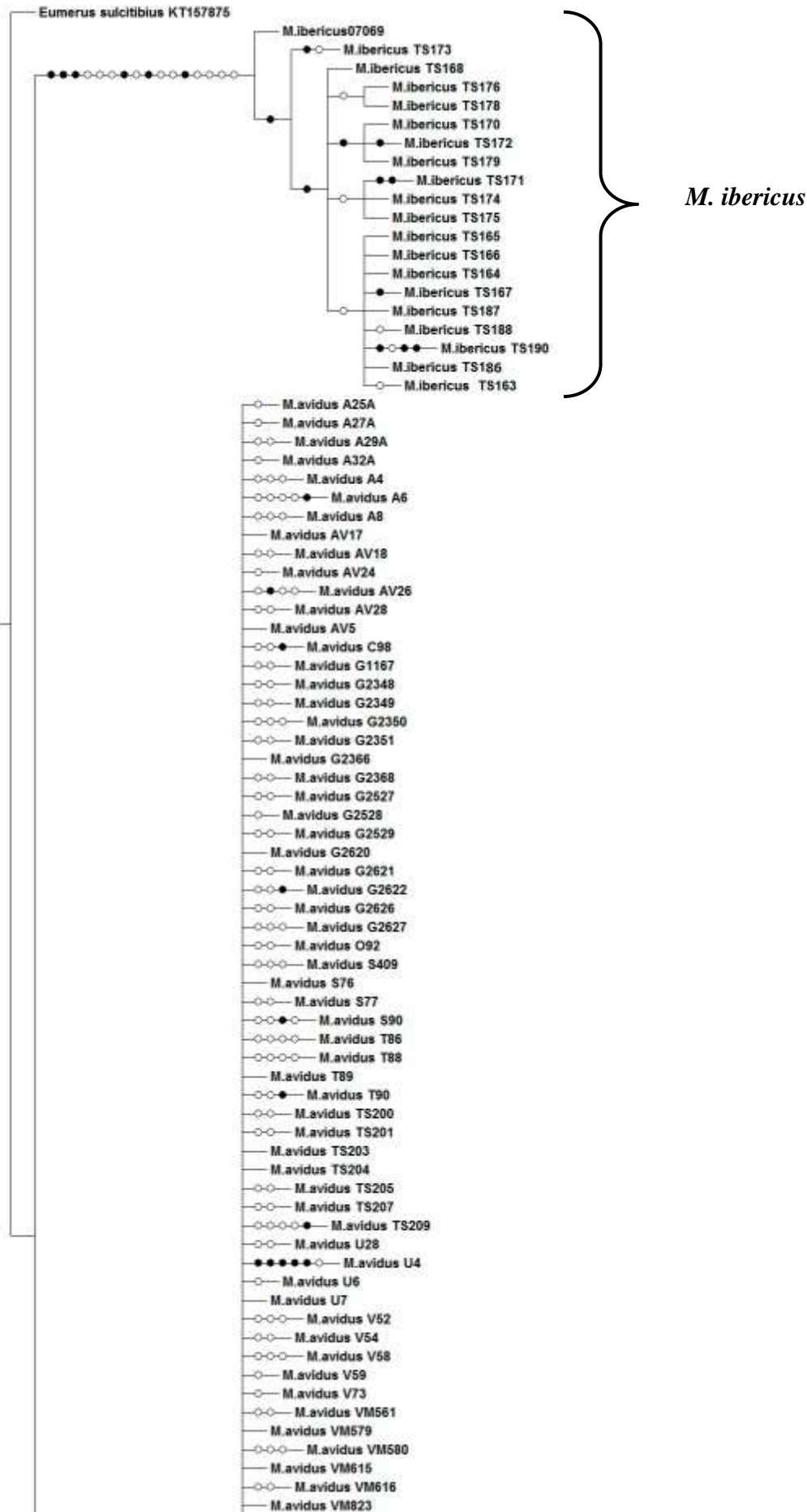
B

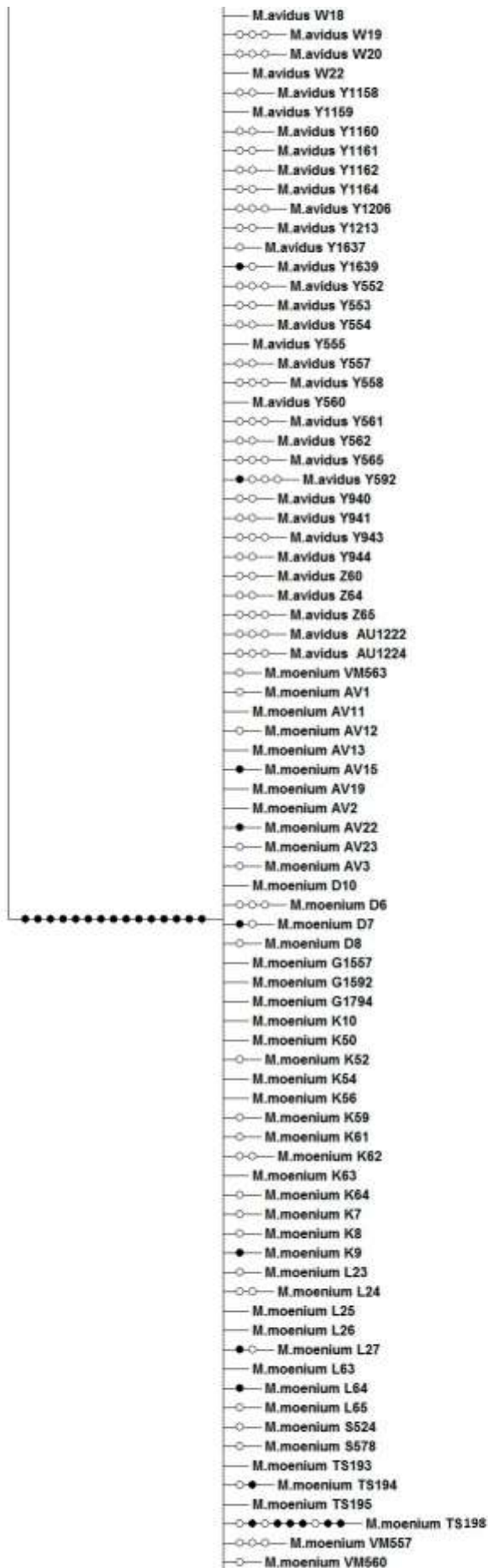


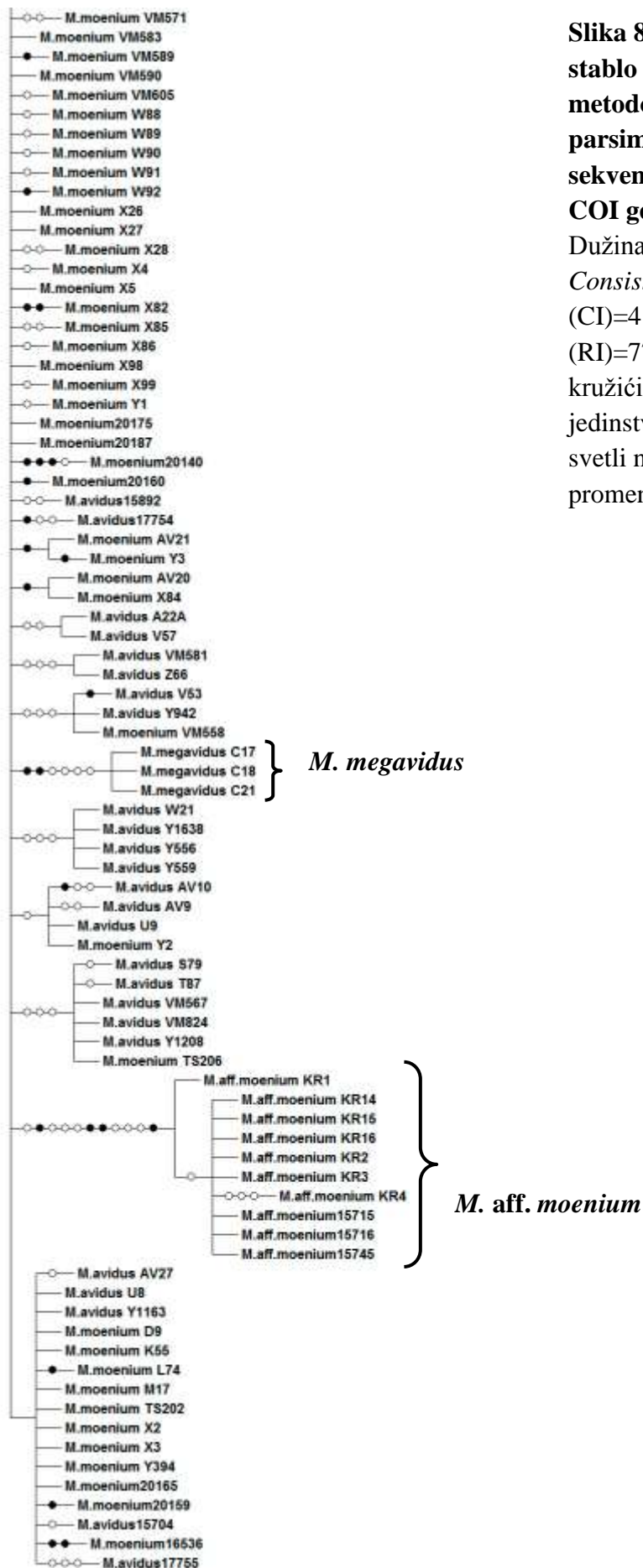
Slika 7. NJ dendrogram (A) i ML stablo (B) bazirani na 3' COI fragmentu mtDNK sekvenci *M. avidus* kompleksa.

Bootstrap vrednosti (1000 replikacija) prikazane su pored grana. MEG-*M. megavidus*

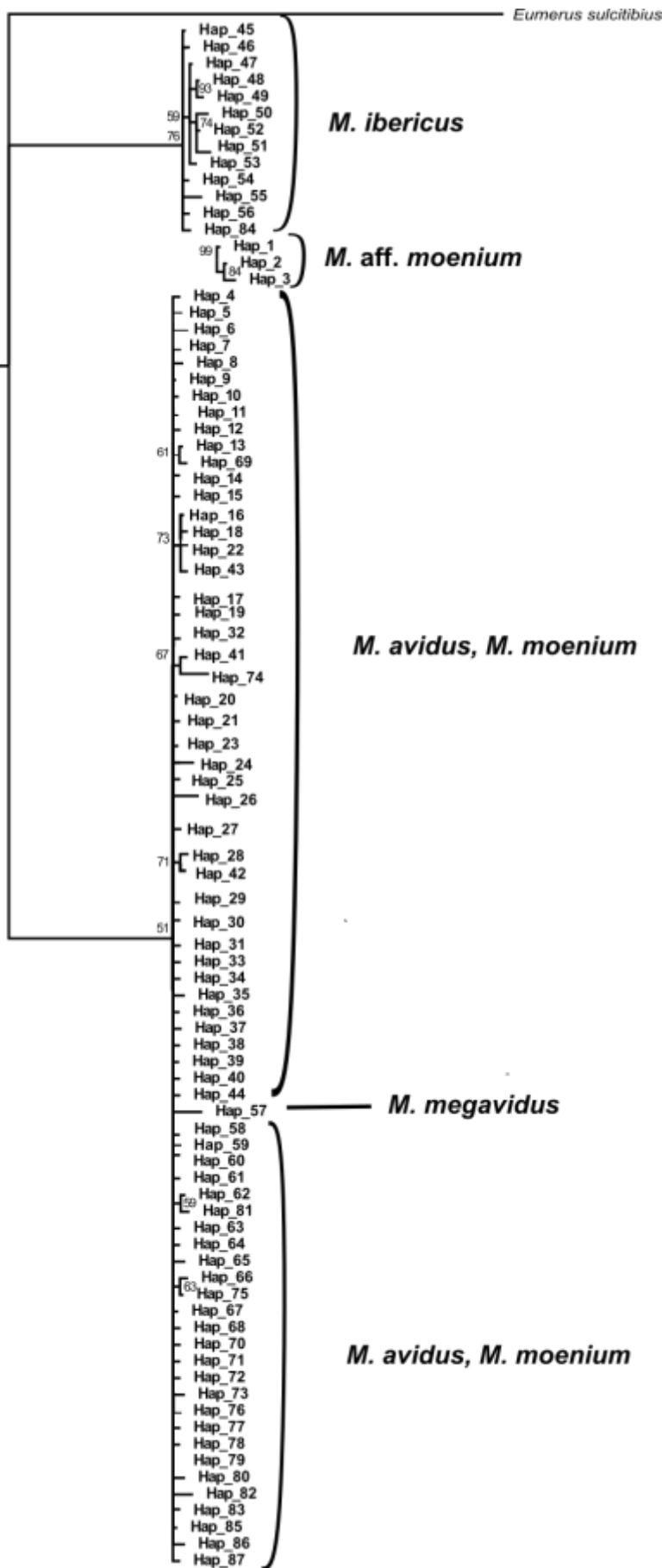








Slika 8. Konsenzus stablo dobijeno metodom maksimalne parsimonije na osnovu sekvenci 3' regiona COI gena mtDNK. Dužina: 446 koraka, Consistency index (CI)=41, Retention Index (RI)=77. Popunjeni kružići ukazuju na jedinstvene promene, a svetli na ne-jedinstvene promene.



Slika 9.
Bajesovo
filogenetičko
stablo
konstruisano na
osnovu 87
haplotipa
3'regiona COI
gena mtDNK.
 Brojevi na
 nodusima
 predstavljaju *a*
posterior
 verovatnoću za
 odgovarajuću
 granu na stablu.

Rezultati svih filogenetičkih analiza sugerisali su jasnu izdvojenost taksona *Merodon aff. moenium*. Kako bi se dodatno testirao stepen genetičke diferencijacije ovog taksona u okviru kompleksa vrsta *M. avidus*, *M. aff. moenium* uvršten je u analizu molekularne varijanse (AMOVA), kao i u analizu Φ statistike, kao posebna vrsta. Pored taksona *M. aff. moenium*, u navedene analize, bazirane na 3' COI sekvencama, uključene su i preostale četiri pretpostavljene vrste ispitivanog kompleksa: *M. avidus*, *M. moenium*, *M. ibericus* i *M. megavidus*.

Procenat interpopulacione varijabilnosti dobijen AMOVA pristupom, bio je znatno veći od procenta utvrđene intrapopulacione varijabilnosti. Fst vrednost od 0,831 potvrdila je postojanje statistički veoma značajne varijabilnosti između označenih populacija, pri čemu je svaka populacija odgovarala jednoj vrsti analiziranog kompleksa (Tabela 5).

Φ st vrednosti, bazirane na varijabilnosti 3' COI sekvence, bile su statistički značajne po svim parovima populacija. Ovo je ukazalo na prisustvo značajne genetičke diferencijacije između svih pretpostavljenih vrsta, uključujući i diferencijaciju između taksona *M. aff. moenium* i svake od ostalih vrsta *M. avidus* kompleksa (Tabela 6).

Tabela 5. Rezultati analize molekularne varijanse (AMOVA) za 3' COI sekvence za 5 populacija u okviru *Merodon avidus* kompleksa: *M. aff. moenium*, *M. megavidus*, *M. ibericus*, *M. moenium*, *M. avidus*

izvor varijabilnosti	procenat varijabilnosti	FST
između populacija	83,08	0,831*
u okviru populacija	16.92	

*p < 0,01

Tabela 6. Parne Φ st vrednosti između *M. aff. moenium*, *M. megavidus*, *M. ibericus*, *M. moenium* i *M. avidus* bazirane na 3'COI sekvencama

	<i>M. aff. moenium</i>	<i>M. megavidus</i>	<i>M. ibericus</i>	<i>M. moenium</i>	<i>M. avidus</i>
<i>M. aff. moenium</i>		+	+	+	+
<i>M. megavidus</i>	0,963		+	+	+
<i>M. ibericus</i>	0,947	0,933		+	+
<i>M. moenium</i>	0,862	0,782	0,952		+
<i>M. avidus</i>	0,808	0,717	0,936	0,175	

Φ st vrednosti ispod dijagonale, statistička značajnost iznad dijagonale, + – p <0,01

6.1.2 Analiza 5'regiona COI gena

Proučavanjem seta sačinjenog od 135 5'COI sekvenci jedinki *M. avidus*, *M. moenium*, *M. ibericus* i *M. aff. moenium*, na osnovu utvrđene 84 varijabilne pozicije (od toga 41 singltona, a 43 parsimonijski informativnih mesta), uočeno je prisustvo 83 mtDNK haplotipa. Diverzitet haplotipova za ukupan set sekvenci iznosio je Hd=0,980, diverzitet nukleoida $\pi=0,016$, a prosečan broj nukleotidnih razlika k=10,066.

Ukupno 29 haplotipova registrovano je samo u okviru vrste *M. avidus*, 24 u okviru vrste *M. moenium*, 20 samo u okviru vrste *M. ibericus* i 5 samo u okviru grupe jedinki označenih kao *Merodon aff. moenium*. Za vrste *M. avidus* i *M. moenium* bilo je prisutno 5 zajedničkih haplotipova (Tabela 7; Tabela 2- Prilog).

Tabela 7. Haplotipovi 5'COI regiona mtDNK i njihova zastupljenost u okviru *M. avidus* kompleksa

Haplotip	Frekvencija (broj pojavljivanja u ukupnom uzorku)	Vrste kod kojih je utvrđen
Hap 1	4	<i>M. aff. moenium</i>
Hap 2	1	<i>M. aff. moenium</i>
Hap 3	1	<i>M. aff. moenium</i>
Hap 4	1	<i>M. aff. moenium</i>
Hap 5	4	<i>M. avidus</i>

Hap 6	1	<i>M. avidus</i>
Hap 7	1	<i>M. avidus</i>
Hap 8	1	<i>M. avidus</i>
Hap 9	13	<i>M. avidus, M. moenium</i>
Hap 10	1	<i>M. avidus</i>
Hap 11	1	<i>M. avidus</i>
Hap 12	1	<i>M. avidus</i>
Hap 13	3	<i>M. avidus</i>
Hap 14	4	<i>M. avidus, M. moenium</i>
Hap 15	1	<i>M. avidus</i>
Hap 16	1	<i>M. avidus</i>
Hap 17	1	<i>M. avidus</i>
Hap 18	1	<i>M. avidus</i>
Hap 19	1	<i>M. avidus</i>
Hap 20	2	<i>M. avidus, M. moenium</i>
Hap 21	7	<i>M. avidus</i>
Hap 22	1	<i>M. avidus</i>
Hap 23	2	<i>M. avidus</i>
Hap 24	1	<i>M. avidus</i>
Hap 25	5	<i>M. avidus, M. moenium</i>
Hap 26	1	<i>M. avidus</i>
Hap 27	1	<i>M. avidus</i>
Hap 28	1	<i>M. avidus</i>
Hap 29	1	<i>M. avidus</i>
Hap 30	1	<i>M. avidus</i>
Hap 31	9	<i>M. avidus, M. moenium</i>
Hap 32	1	<i>M. avidus</i>
Hap 33	1	<i>M. avidus</i>
Hap 34	1	<i>M. avidus</i>
Hap 35	1	<i>M. avidus</i>
Hap 36	1	<i>M. avidus</i>
Hap 37	1	<i>M. avidus</i>
Hap 38	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 39	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 40	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 41	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 42	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 43	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 44	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 45	2	<i>M. ibericus</i>
Hap 46	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 47	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 48	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 49	2	<i>M. ibericus</i>
Hap 50	1	<i>M. ibericus</i>

Hap 51	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 52	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 53	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 54	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 55	2	<i>M. ibericus</i>
Hap 56	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 57	1	<i>M. moenium</i>
Hap 58	1	<i>M. moenium</i>
Hap 59	1	<i>M. moenium</i>
Hap 60	1	<i>M. moenium</i>
Hap 61	1	<i>M. moenium</i>
Hap 62	2	<i>M. moenium</i>
Hap 63	1	<i>M. moenium</i>
Hap 64	1	<i>M. moenium</i>
Hap 65	1	<i>M. moenium</i>
Hap 66	1	<i>M. moenium</i>
Hap 67	1	<i>M. moenium</i>
Hap 68	1	<i>M. moenium</i>
Hap 69	1	<i>M. moenium</i>
Hap 70	4	<i>M. moenium</i>
Hap 71	1	<i>M. moenium</i>
Hap 72	1	<i>M. moenium</i>
Hap 73	1	<i>M. moenium</i>
Hap 74	1	<i>M. moenium</i>
Hap 75	1	<i>M. moenium</i>
Hap 76	1	<i>M. moenium</i>
Hap 77	2	<i>M. moenium</i>
Hap 78	1	<i>M. moenium</i>
Hap 79	1	<i>M. moenium</i>
Hap 80	1	<i>M. moenium</i>
Hap 81	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 82	3	<i>M. aff. moenium</i>
Hap 83	1	<i>M. avidus</i>

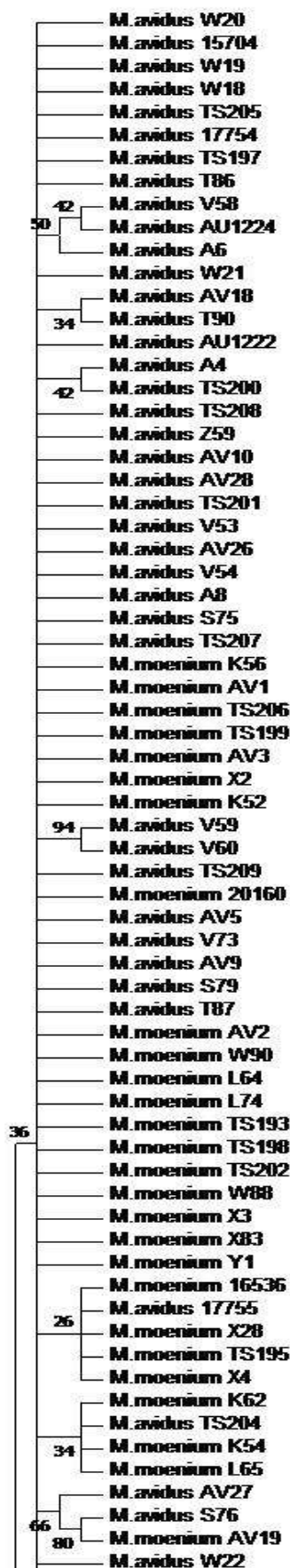
Sve filogenetičke analize sekvenci 5' regiona COI gena mtDNK rezultovale su sličnom topološkom slikom, u kojoj su se izdvojila dva klastera: *M. ibericus* i *M. aff. moenium*, uz odsustvo razdvajanja sekvenci vrsta *M. avidus* i *M. moenium* u zasebne klastere (Slike 10 i 11). Bajesovo filogenetičko stablo haplotipova grupisalo je haplotipove koji pripadaju vrsti *M. ibericus* i taksonu *M. aff. moenium* u zasebne klastere, dok su treći klaster činili haplotipovi vrsta *M. avidus* i *M. moenium* (Slika 12). Dok je, u analizi 3' kraja COI gena, kod jedinki sa ostrva Evia i poluostrva Peloponez pronađen jedan od haplotipova

detektovan kod jedinki sa ostrva Krf (Hap 2) (Tabela 1-Prilog), u 5' COI regionu istih jedinki pronađen je novi haplotip (Hap 82) (Tabela 2-Prilog). Ovaj haplotip je filogenetički grupisan u isti klaster sa ostalim 5' COI haplotipovima taksona *M. aff. moenium* (Hap 1,2,3,4), detektovanim kod jedinki uzorkovanih na ostrvu Krf (Slika 12).

A

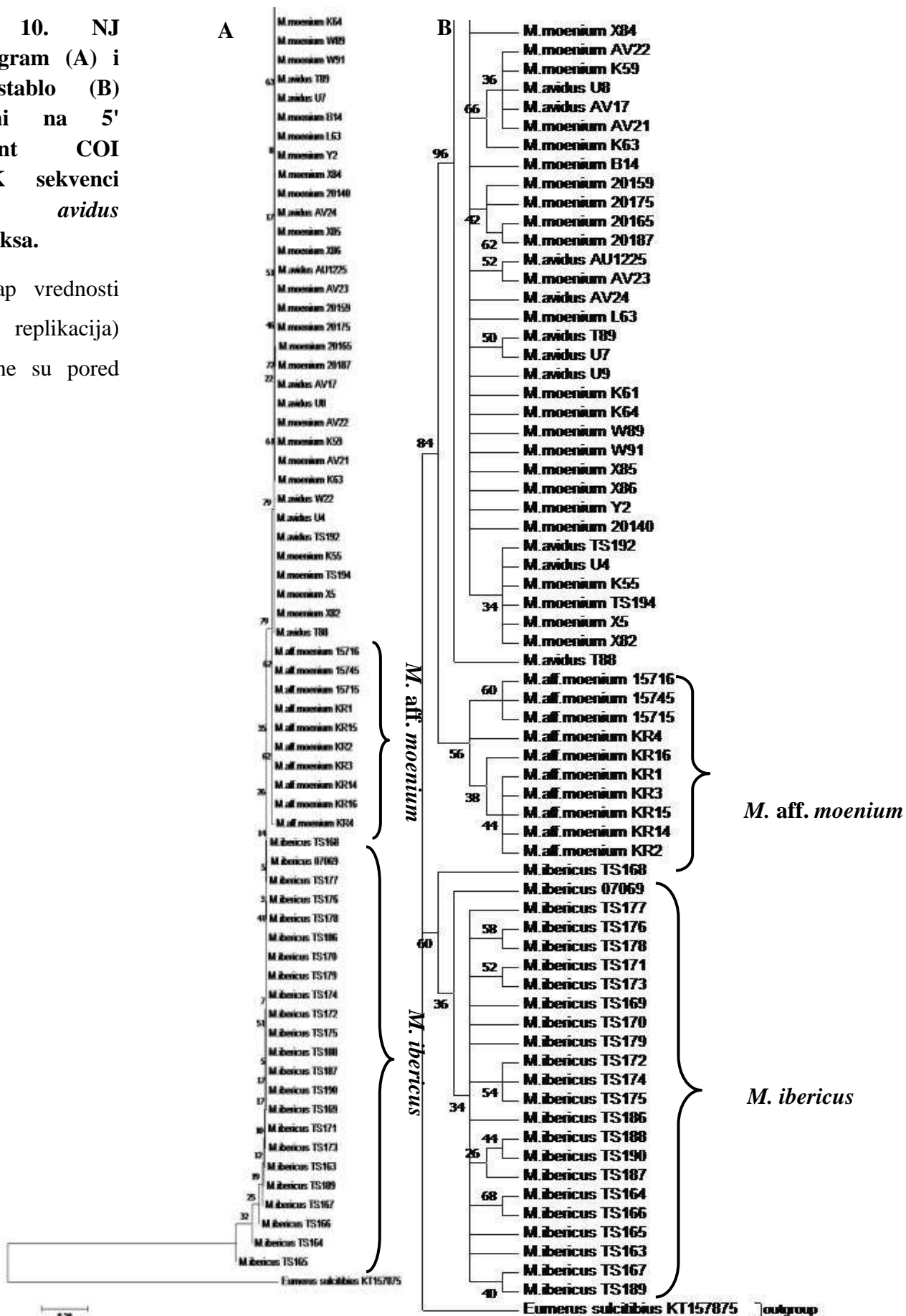


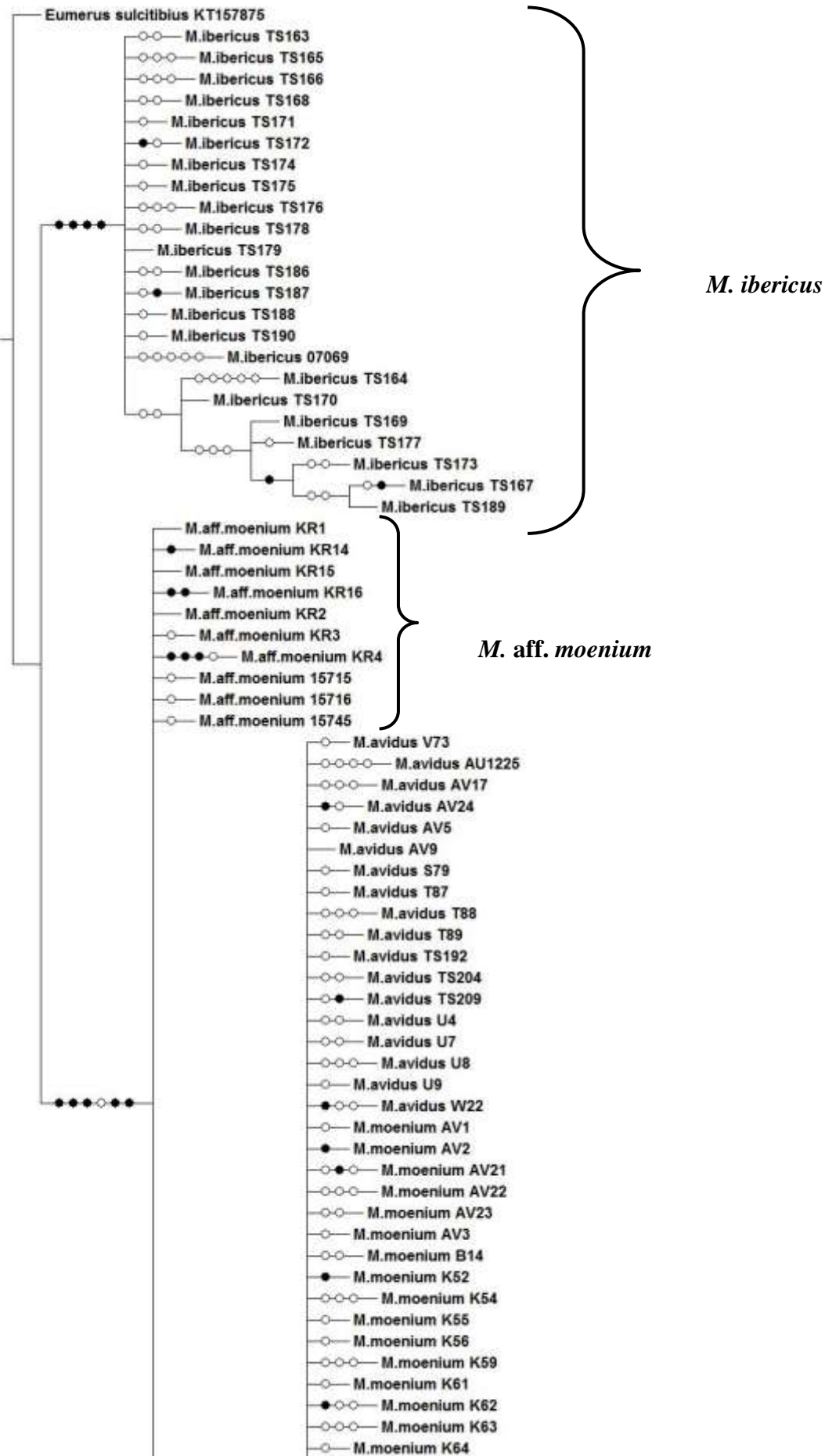
B

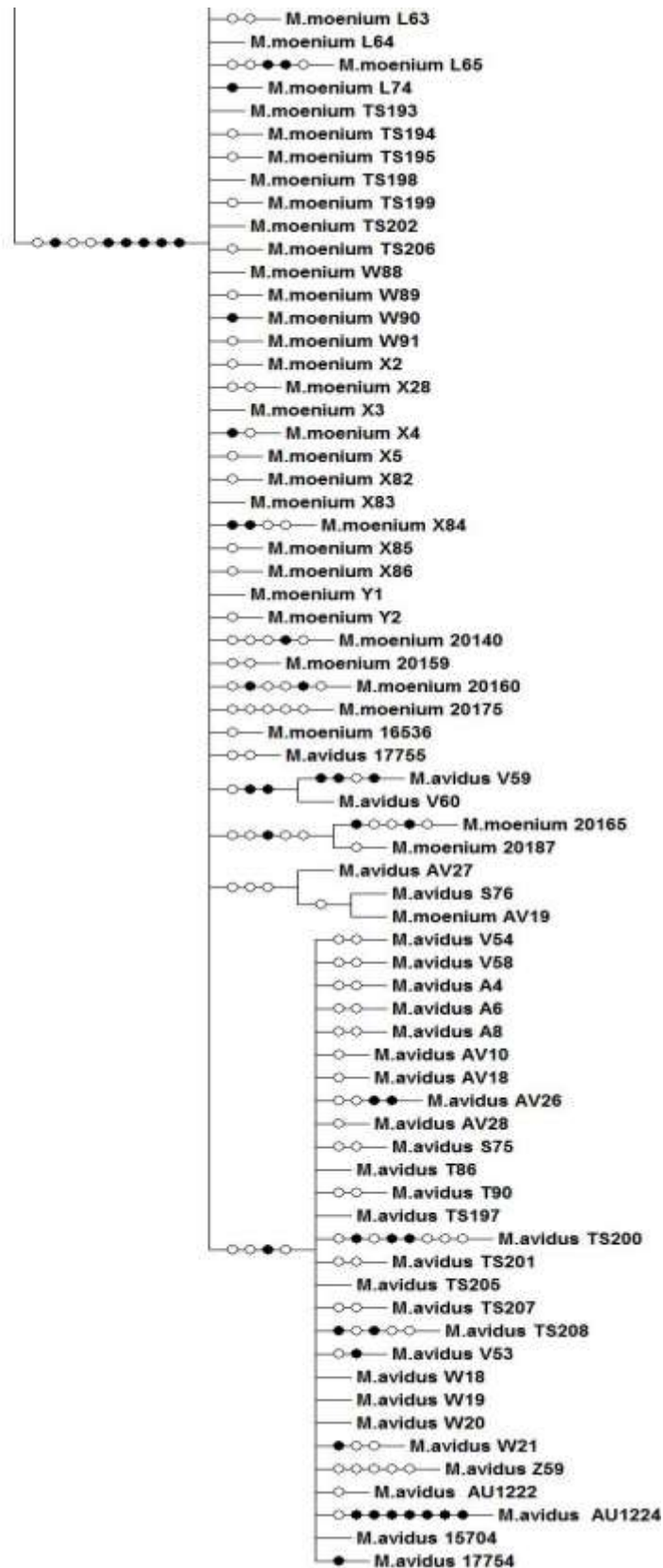


Slika 10. NJ dendrogram (A) i ML stablo (B) bazirani na 5' fragment COI mtDNK sekvenci *M. avidus* kompleksa.

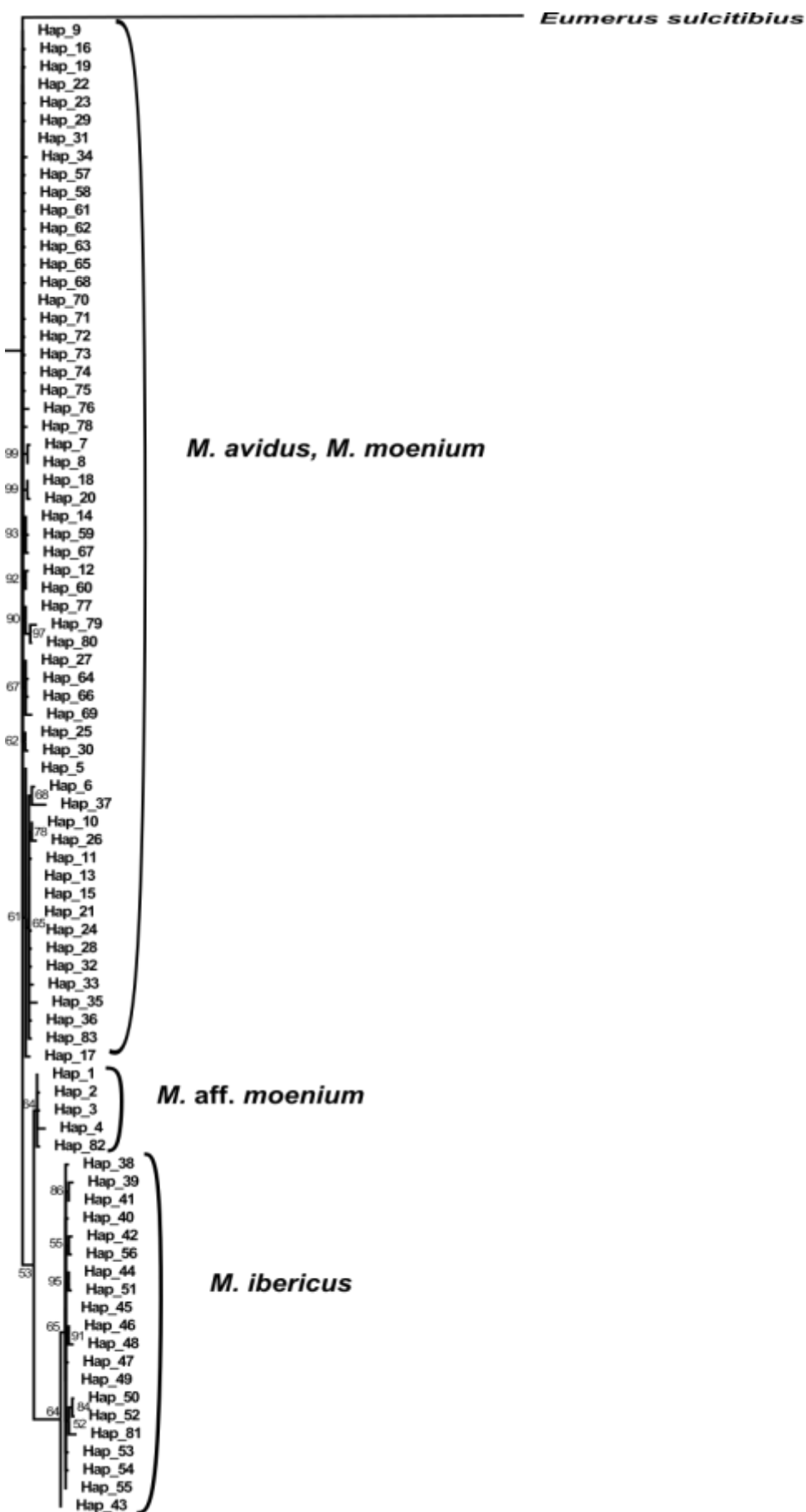
Bootstrap vrednosti (1000 replikacija) prikazane su pored stabala.







Slika 11. Konsenzus stablo dobijeno metodom maksimalne parsimonije na osnovu sekvenci 5' regiona COI gena mtDNK. Dužina: 594 koraka, *Consistency index* (CI)=70, *Retention Index* (RI)=79. Popunjeni kružići ukazuju na jedinstvene promene, a svetli na ne-jedinstvene promene.



Slika 12. Bajesovo filogenetičko stablo konstruisano na osnovu 83 haplotipa 5'COI-mtDNK. Brojevi na nodusima predstavljaju a posteriori verovatnoću za odgovarajuću granu na stablu.

Rezultati svih filogenetičkih analiza 5'COI sekvenci sugerisali su, kao i u slučaju 3' regiona COI gena, jasnu izdvojenost taksona *M. aff. moenium*. Kako bi se dodatno testirao stepen genetičke diferencijacije ove grupe u okviru kompleksa vrsta *M. avidus*, *M. aff. moenium* uvršten je u analizu molekularne varijanse (AMOVA), kao i u analizu Φ statsike, kao posebna populacija. Pored populacije *M. aff. moenium*, u navedene analize, bazirane na 5'COI sekvencama, uključene su i tri pretpostavljene vrste ispitivanog kompleksa: *M. avidus*, *M. moenium* i *M. ibericus*.

Procenat interpopulacione varijabilnosti dobijen AMOVA pristupom, bio je znatno veći od procenta utvrđene intrapopulacione varijabilnosti. Fst vrednost od 0,748 potvrdila je postojanje statistički veoma značajne varijabilnosti između označenih populacija (Tabela 8).

Pri svim poređenjima genetičke diferencijacije po parovima populacija, uključujući poređenje populacije (vrste) *M. aff. moenium* sa svim ostalim vrstama analiziranog kompleksa, parne Φ st vrednosti bazirane na varijabilnosti 5'COI sekvence bile su statistički značajne (Tabela 9).

Tabela 8. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) za 5'COI sekvence za 4 populacije u okviru *Merodon avidus* kompleksa: *M. aff. moenium*, *M. ibericus*, *M. moenium*, *M. avidus*

Izvor varijabilnosti	Procenat varijabilnosti	FST
između populacija	74.83	0,748*
u okviru populacija	25.17	

*p < 0,01

Tabela 9. Parne Φ st vrednosti između *M. aff. moenium*, *M. ibericus*, *M. moenium* i *M. avidus* bazirane na 5'COI barkod sekvencama

	<i>M. aff. moenium</i>	<i>M. ibericus</i>	<i>M. moenium</i>	<i>M. avidus</i>
<i>M. aff. moenium</i>		+	+	+
<i>M. ibericus</i>	0,844		+	+
<i>M. moenium</i>	0,760	0,878		+
<i>M. avidus</i>	0,655	0,836	0,146	

Φ st vrednosti ispod dijagonale, statistička značajnost iznad dijagonale, + – p < 0,01

6.1.3 Analiza ukupnih sekvenci COI gena

U uzorku od 120 jedinki *M. avidus*, *M. moenium*, *M. ibericus* i *M. aff. moenium* za koje je formirana ukupna 3'COI/5'COI sekvencija, utvrđeno je prisustvo 90 mtDNK haplotipova. Haplotipovi su definisani na osnovu 163 varijabilne pozicije, od kojih su 73 mesta označena kao singltoni, dok je 90 mesta bilo informativno sa aspekta parsimonije. Diverzitet haplotipova za ukupan set sekvenci iznosio je $Hd=0,991$, diverzitet nukleoida $\pi=0,017$, a prosečan broj nukleotidnih razlika $k=21,214$.

Ukupno 37 haplotipova registrovano je samo u okviru vrste *M. moenium*, 31 samo u okviru vrste *M. moenium*, 15 samo u okviru vrste *M. ibericus* i 5 samo u okviru grupe jedinki označenih kao *M. aff. moenium*. Za vrste *M. avidus* i *M. moenium* bilo je prisutno 2 zajednička haplotipa (Tabela 10; Tabela 3-Prilog).

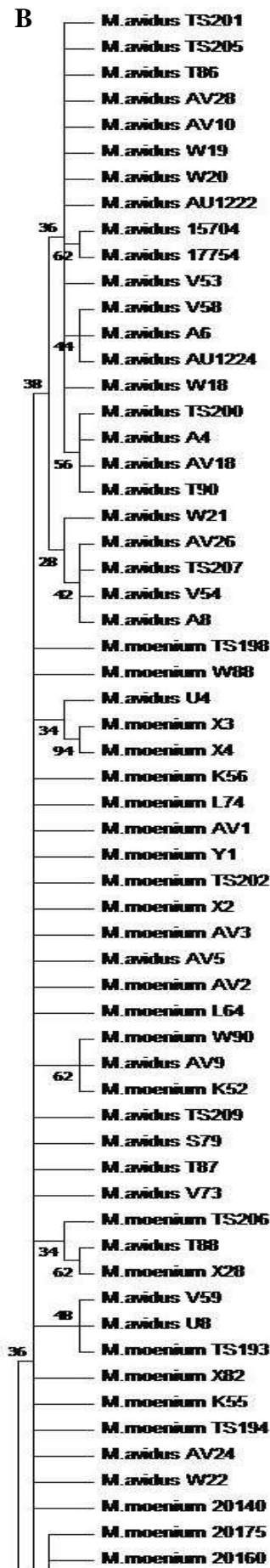
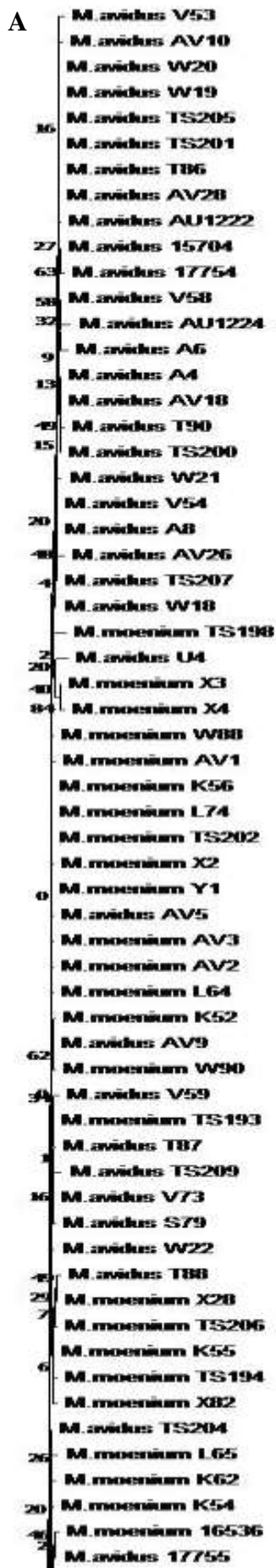
Tabela 10. Haplotipovi ukupno analiziranog COI gena mtDNK i njihova zastupljenost u okviru *M. avidus* kompleksa

Haplotip	Frekvencija (broj pojavljivanja u ukupnom uzorku)	Vrste kod kojih je utvrđen
Hap 1	4	<i>M. aff. Moenium</i>
Hap 2	1	<i>M. aff. Moenium</i>
Hap 3	1	<i>M. aff. Moenium</i>
Hap 4	1	<i>M. aff. Moenium</i>
Hap 5	1	<i>M. avidus</i>
Hap 6	3	<i>M. avidus</i>
Hap 7	1	<i>M. avidus</i>
Hap 8	1	<i>M. avidus</i>
Hap 9	1	<i>M. avidus</i>
Hap 10	3	<i>M. avidus</i>
Hap 11	1	<i>M. avidus</i>
Hap 12	1	<i>M. avidus</i>
Hap 13	8	<i>M. avidus, M. Moenium</i>
Hap 14	1	<i>M. avidus</i>
Hap 15	1	<i>M. avidus</i>
Hap 16	1	<i>M. avidus</i>

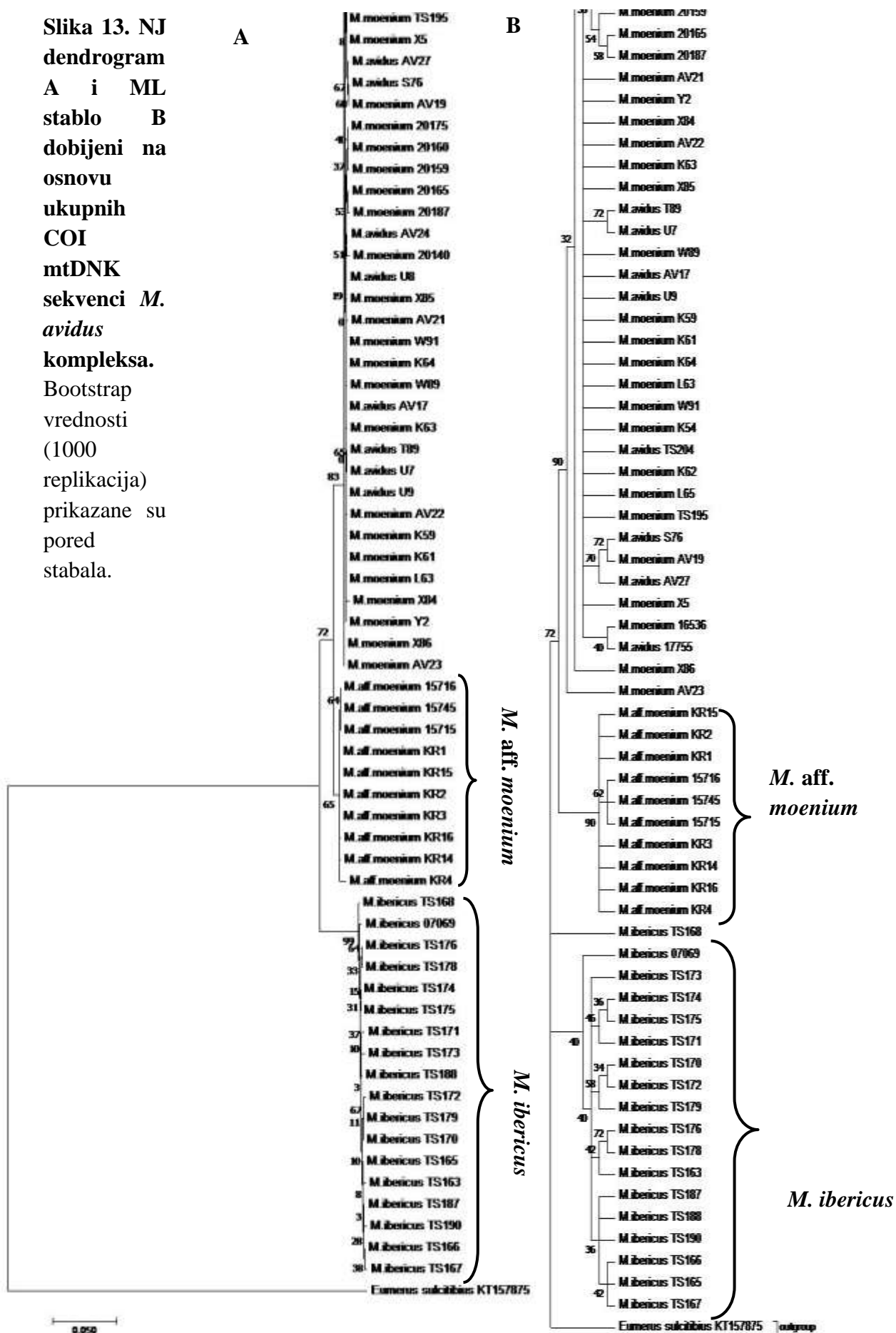
Hap 17	6	<i>M. avidus</i>
Hap 18	1	<i>M. avidus</i>
Hap 19	1	<i>M. avidus</i>
Hap 20	2	<i>M. avidus, M. Moenium</i>
Hap 21	1	<i>M. avidus</i>
Hap 22	1	<i>M. avidus</i>
Hap 23	1	<i>M. avidus</i>
Hap 24	2	<i>M. avidus</i>
Hap 24	1	<i>M. avidus</i>
Hap 25	1	<i>M. avidus</i>
Hap 26	1	<i>M. avidus</i>
Hap 27	1	<i>M. avidus</i>
Hap 28	1	<i>M. avidus</i>
Hap 29	1	<i>M. avidus</i>
Hap 30	1	<i>M. avidus</i>
Hap 31	1	<i>M. avidus</i>
Hap 32	1	<i>M. avidus</i>
Hap 33	1	<i>M. avidus</i>
Hap 34	1	<i>M. avidus</i>
Hap 35	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 36	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 37	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 38	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 39	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 40	2	<i>M. ibericus</i>
Hap 41	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 42	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 43	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 44	2	<i>M. ibericus</i>
Hap 45	2	<i>M. ibericus</i>
Hap 46	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 47	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 48	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 49	1	<i>M. moenium</i>
Hap 50	1	<i>M. moenium</i>
Hap 51	1	<i>M. moenium</i>
Hap 52	1	<i>M. moenium</i>
Hap 53	1	<i>M. moenium</i>
Hap 54	1	<i>M. moenium</i>
Hap 55	1	<i>M. moenium</i>
Hap 56	1	<i>M. moenium</i>
Hap 57	1	<i>M. moenium</i>
Hap 58	4	<i>M. moenium</i>
Hap 59	1	<i>M. moenium</i>
Hap 60	1	<i>M. moenium</i>

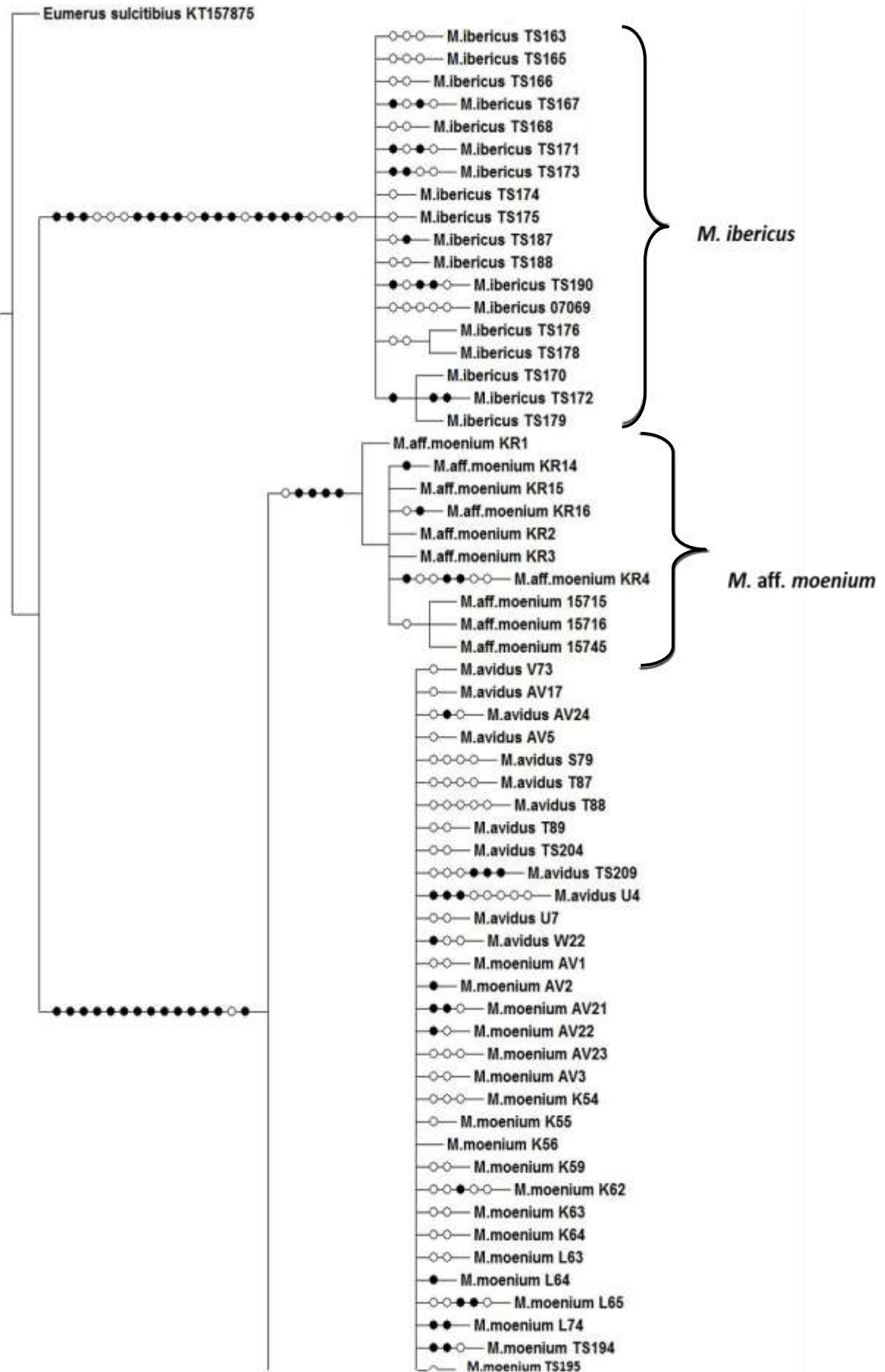
Hap 61	1	<i>M. moenium</i>
Hap 62	1	<i>M. moenium</i>
Hap 63	1	<i>M. moenium</i>
Hap 64	1	<i>M. moenium</i>
Hap 65	2	<i>M. moenium</i>
Hap 66	1	<i>M. moenium</i>
Hap 67	1	<i>M. moenium</i>
Hap 68	1	<i>M. moenium</i>
Hap 69	1	<i>M. moenium</i>
Hap 70	1	<i>M. moenium</i>
Hap 71	1	<i>M. moenium</i>
Hap 72	1	<i>M. moenium</i>
Hap 73	1	<i>M. moenium</i>
Hap 74	1	<i>M. moenium</i>
Hap 75	1	<i>M. moenium</i>
Hap 76	1	<i>M. moenium</i>
Hap 77	1	<i>M. moenium</i>
Hap 78	1	<i>M. moenium</i>
Hap 79	1	<i>M. moenium</i>
Hap 80	1	<i>M. moenium</i>
Hap 81	1	<i>M. moenium</i>
Hap 82	1	<i>M. moenium</i>
Hap 83	1	<i>M. moenium</i>
Hap 84	1	<i>M. moenium</i>
Hap 85	1	<i>M. ibericus</i>
Hap 86	1	<i>M. avidus</i>
Hap 87	3	<i>M. aff. Moenium</i>
Hap 88	1	<i>M. moenium</i>
Hap 89	1	<i>M. avidus</i>
Hap 90	1	<i>M. avidus</i>

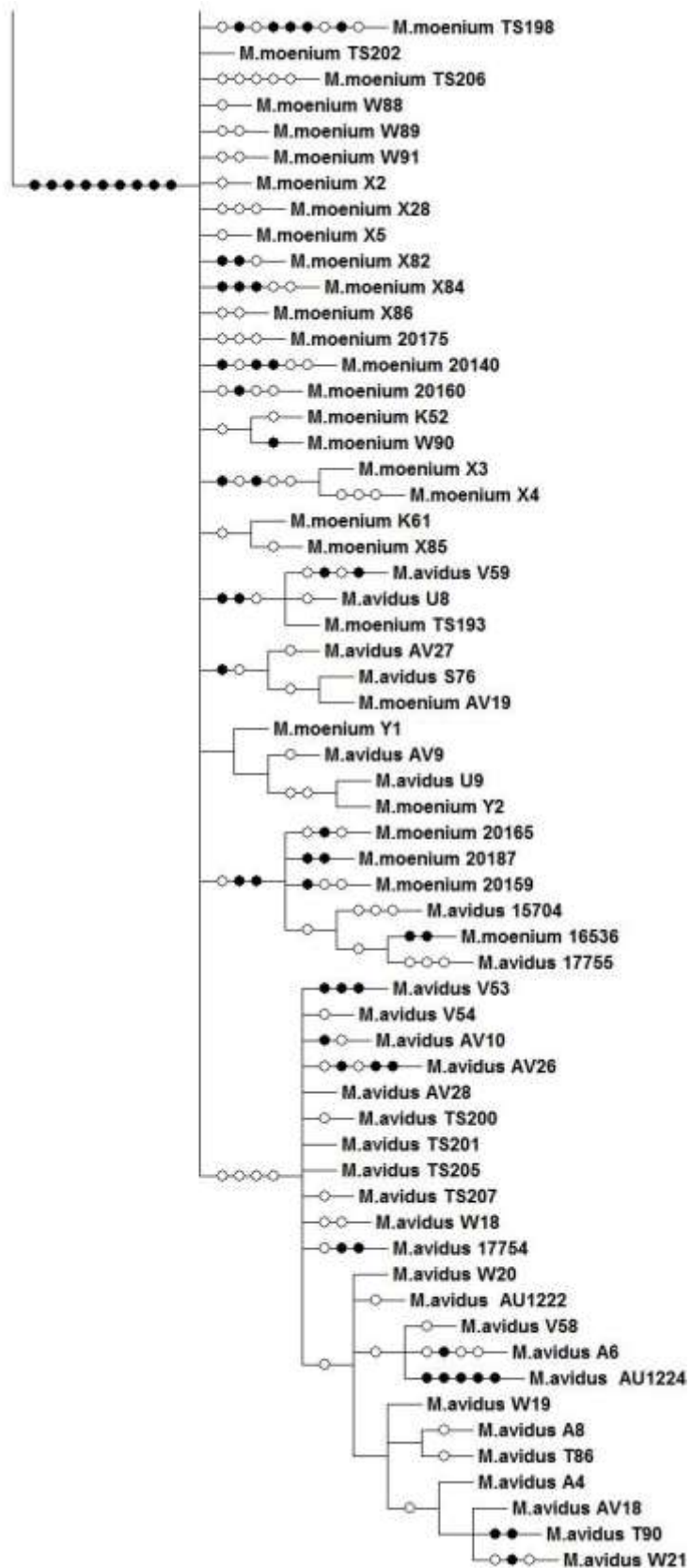
Sve filogenetičke analize ukupnih COI DNK sekvenci rezultovale su sličnom topološkom slikom, u kojoj su se izdvojila dva klastera: *M. ibericus* i *M. aff. moenium*, dok su preostali klasteri grupisali zajedno sekvence vrsta *M. avidus* i *M. moenium* (Slike 13 i 14). Bajesovo filogenetičko stablo haplotipova takođe je grupisalo haplotipove koji pripadaju vrsti *M. ibericus* i populaciji *M. aff. moenium* u zasebne klasterne, dok su preostali klasteri pripali haplotipovima vrsta *M. avidus* i *M. moenium* (Slika 15). U okviru taksona *M. aff. moenium*, kod jedinki sa ostrva Evia i poluostrva Peloponez pronađen je novi haplotip (Hap 87), koji je filogenetički grupisan u isti klaster sa ostalim haplotipovima taksona *M. aff. moenium* (Hap 1,2,3,4), detektovanim kod jedinki uzorkovanih na ostrvu Krf (Slika 15; Tabela 3-Prilog).



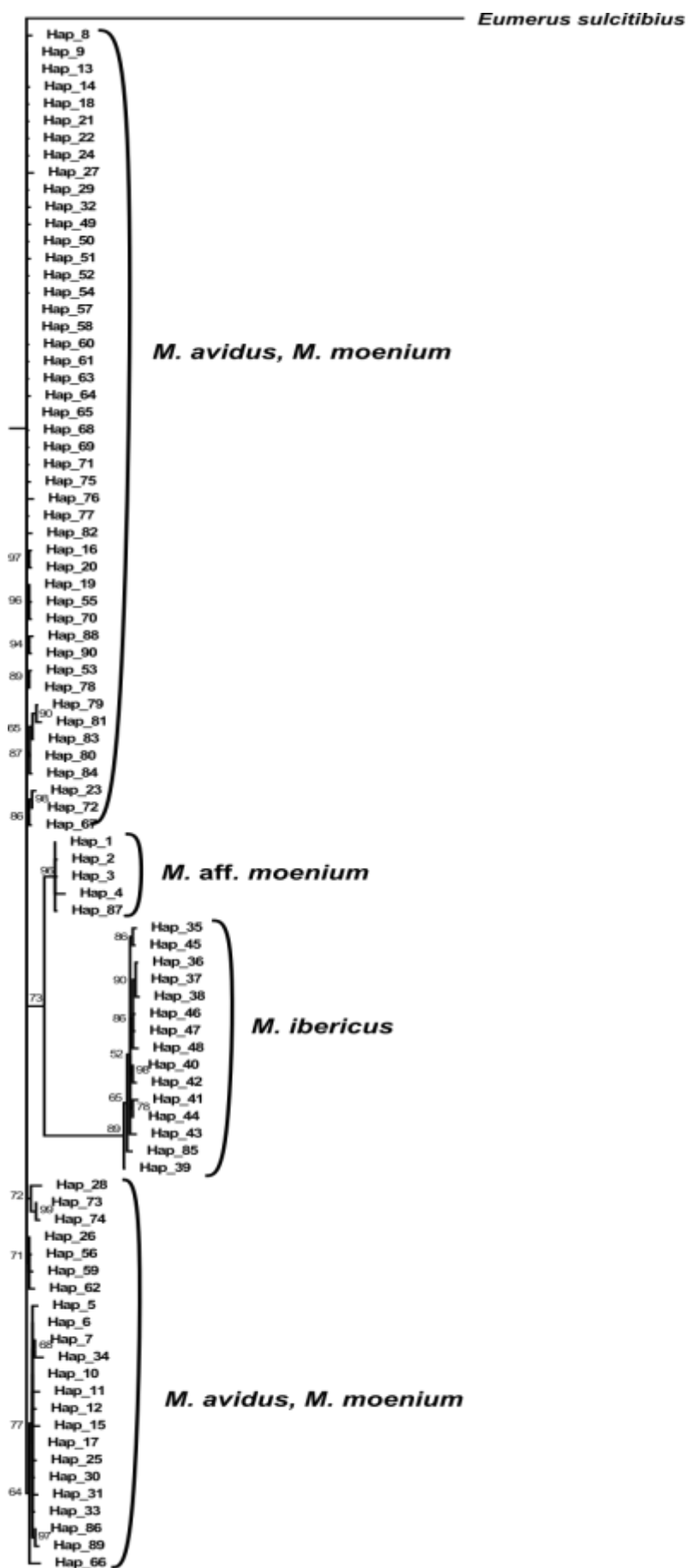
Slika 13. NJ dendrogram A i ML stablo B dobijeni na osnovu ukupnih COI mtDNK sekvenci *M. avidus* kompleksa. Bootstrap vrednosti (1000 replikacija) prikazane su pored stabala.







Slika 14. Konsenzus stablo dobijeno metodom maksimalne parsimonije na osnovu sekvenci ukupnog COI regiona mtDNK. Dužina: 707 koraka, *Consistency index* (CI)=73, *Retention Index* (RI)=87. Popunjeni kružići ukazuju na jedinstvene promene, a svetli na ne-jedinstvene promene.



Slika 15. Bajesovo filogenetičko stablo konstruisano na osnovu 90 haplotipova ukupne COI mtDNK. Brojevi na nodusima predstavljaju *a posterior* verovatnoću za odgovarajuću granu na stablu.

Filogenetičke analize ukupnog regiona COI gena sugerisale su, ponovo, jasnu izdvojenost taksona *M. aff. moenium*. Kako bi se dodatno testirao stepen njegove genetičke diferencijacije u okviru kompleksa vrsta *M. avidus*, *M. aff. moenium* uvršten je u analizu molekularne varijanse (AMOVA), kao i u analizu Φ statistike, kao posebna populacija. Pored populacije *M. aff. moenium*, u navedene analize, bazirane na ukupnim COI sekvencama, uključene su još tri populacije, koje su odgovarale pretpostavljenim vrstama ispitivanog kompleksa: *M. avidus*, *M. moenium* i *M. ibericus*.

Procenat interpopulacione varijabilnosti dobijen AMOVA pristupom, bio je znatno veći od procenta utvrđene intrapopulacione varijabilnosti. Fst vrednost od 0,842 potvrdila je postojanje statistički veoma značajne varijabilnosti između označenih populacija (Tabela 11).

Pri svim preostalim poređenjima, uključujući poređenje populacije *M. aff. moenium* sa svim ostalim populacijama, parne Φ st vrednosti bile su statistički značajne (Tabela 12). Ovo je ukazalo na postojanje značajne genetičke diferencijacije između svih pretpostavljenih vrsta analiziranog kompleksa.

Tabela 11. AMOVA ukupnih COI sekvenci za 4 populacije u okviru *Merodon avidus* kompleksa: *M. aff. moenium*, *M. ibericus*, *M. moenium*, *M. avidus*

Izvor varijabilnosti	Procenat varijabilnosti	FST
između populacija	84,16	0,842*
u okviru populacija	15,84	

*p <0,01

Tabela 12. Parne Φ st vrednosti između *M. aff. moenium*, *M. ibericus*, *M. moenium* i *M. avidus* bazirane na ukupnim barkod sekvencama

	<i>M. aff. moenium</i>	<i>M. ibericus</i>	<i>M. moenium</i>	<i>M. avidus</i>
<i>M. aff. moenium</i>		+	+	+
<i>M. ibericus</i>	0,934		+	+
<i>M. moenium</i>	0,806	0,928		+
<i>M. avidus</i>	0,777	0,915	0,140	

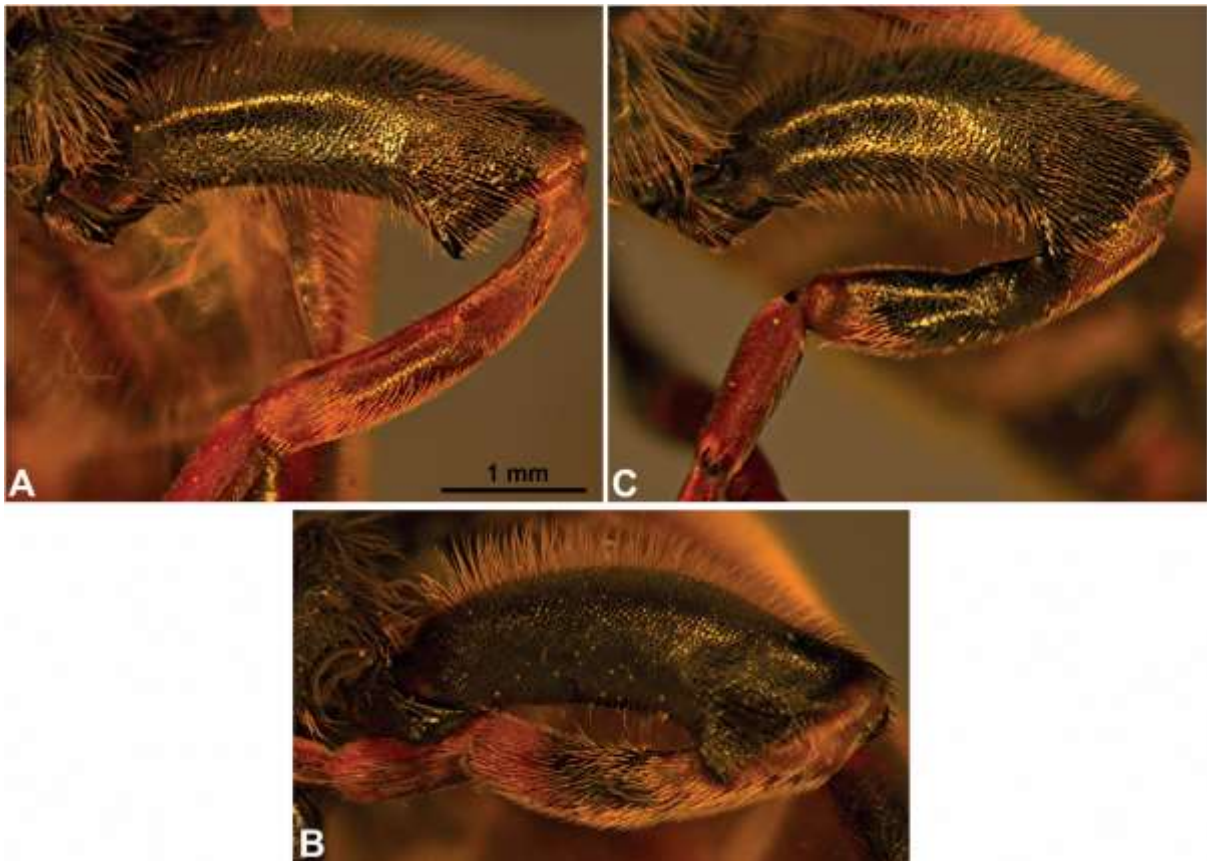
Φ st vrednosti ispod dijagonale, statistička značajnost iznad dijagonale, +=p <0,01

6.2 Analiza alozimske varijabilnosti

Nemogućnost detekcije genetičkog razdvajanja pretpostavljeno kriptičnih vrsta *M. avidus* i *M. moenium* upotrebom DNK barkod sistema, ukazala je na potrebu za uključivanjem dodatnog tipa markera u genetičku karakterizaciju navedenih taksona. Preliminarna identifikacija jedinki uvrštenih u analizu enzimskih lokusa izvršena je na osnovu lokaliteta i sezone njihovog uzorkovanja, kao i na osnovu morfoloških karaktera opisanih u nastavku.

6.2.1 Morfološke karakteristike taksona *Merodon avidus* i *Merodon moenium*

Uprkos velikoj morfološkoj sličnosti, razdvajanje *M. moenium* od tipičnih primeraka kasne letnje i jesenje generacije *M. avidus* moguće je na osnovu dijagnostičkih morfoloških karaktera, opisanih od strane Milankov i sar. 2001. *M. avidus* se odlikuje parom beličastih, mikrotrihoznih tačaka na tergitu 2 i širokim mikrotrihoznim linijama na tergitema 3 i 4 (Slika 4a,b; Slika 1A-Prilog). Tibije su obično blede (Slika 16a; Slika 3A-Prilog), a dlačice na telu nešto kraće, naročito na apikalnim tergitema (Slika 2A-Prilog). Kod *M. moenium* je tergite 2 besprekora i sjajan, dok su na tergitema 3 i 4 prisutne uske mikrotrihozne pruge (Slika 2C, Slika 1C-Prilog). Tibije su uvek delimično tamne (Slika 16c; Slika 3C-Prilog) i dlačice na telu su duže (Slika 2B-Prilog). Kod obe vrste prisutne su narandžaste, bočne, trouglaste fleke na tergitu 3, ali je, kod *M. avidus*, anteriorni deo tergita 3 takođe dominantno narandžast, izuzev medialno, gde je prisutna uska crna obojenost (kod tamnijih primeraka, anteriosublateralno su uvek prisutna narandžasta područja, makar i male površine) (Slika 4a,b; Slika 1A-Prilog). Nasuprot tome, tergite 3 vrste *M. moenium* je crn (kod ženki je anteriolateralno narandžasto-crven, ali sa crnom posteriornom marginom, dok su kod oba pola *M. avidusa* posteriorne margine tergita 2-4 svetlije) (Slika 4c; Slika 1B-Prilog).

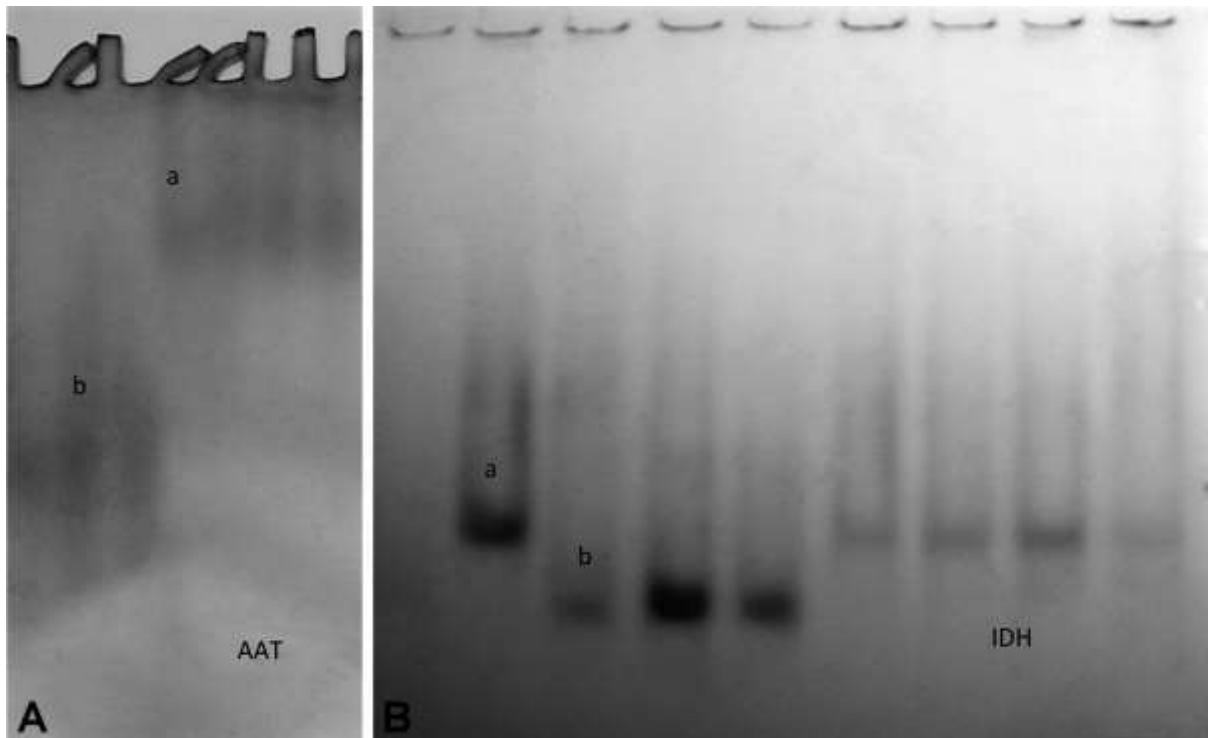


Slika 16. Noga mužjaka, lateralna strana: a-*M. avidus* (jesenja generacija), b-*M. avidus* (prolećna generacija), c-*M. moenium*

Značajno je istaći da su navedeni morfološki karakteri veoma postojani u populacijama *M. moenium*, ali mogu varirati u okviru populacija *M. avidusa*, što, kako je već pomenuto, dovodi do vizuelnih razlika između prolećne i kasno letnje/jesenje generacije iste vrste. Stoga se neki primerci rano-prolećne generacije *M. avidusa* (najčešće aktivni u prvoj polovini maja), od neznatno svetlijih primeraka *M. moenium* razlikuju samo po tamnijoj obojenosti tibije (Slika 16b; Slika 3B-Prilog), tamnijem tergitu 3 i manje mikrotrihoznim tergitema (Slika 4b). U slučajevima ovakve morfološke sličnosti pojedinih primeraka, za inicijalnu identifikaciju jedinki uvrštenih u genetičku analizu, korišćeni su geografski podaci (*M. moenium* je dominantnije rasprostranjen u kontinentalnim područjima, a *M. avidus* u mediteranskim) i sezonski podaci (adulti *M. moenium* obično počinju da lete početkom juna i nisu aktivni posle avgusta). Na osnovu sezone aktivnosti adulata, jedinke su se mogle podeliti na rano-prolećne (aktivne u IV i V mesecu u godini), kasno-prolećne/letnje (aktivne u VI i VII mesecu) i jesenje (aktivne u VIII i IX mesecu).

6.2.2 Varijabilnost enzimskih lokusa i struktura analiziranih populacija

Od ukupno pet enzimskih lokusa, analiziranih u 19 populacija *M. avidus* i *M. moenium*, četiri lokusa pokazala su se polimorfnim u svim analiziranim parovima (*M. avidus*/*M. moenium*) populacija: GPD, IDH, GPI i ME. Nasuprot tome, u AAT lokusu, detekovano je prisustvo samo jednog alela (a) u svim populacijama preliminarno označenim kao *M. avidus*, i samo drugog alela (b), u svim populacijama preliminarno označenim kao *M. moenium*. (Tabela 13, Tabela 15, Slika 17). Na osnovu toga se zaključuje da se AAT lokus može smatrati dijagnostičkim za razdvajanje ovih kriptičnih taksona *M. avidus* kompleksa, što je sugerisano i od strane Milankov i sar. (2001). Prosečan broj alela u analiziranim populacijama varirao je od 1,40 (populacije Orjen, Crna Gora, *M. moenium*) do 2,33 (populacija Piemonte Cuneo, Italija, *M. avidus*) (Tabela 13). Prosečan broj alela za sve lokuse i sve populacije *M. avidus/moenium*, posmatrano istovremeno, iznosio je 2,4. Sa izuzetkom AAT lokusa, koji se pokazao monomorfnim i specifičnim za vrstu *M. avidus* ili *M. moenium*, nije zabeleženo prisustvo alela sa retkom frekvencijom ($<0,1$), niti jedinstvenih alela, ni u jednoj od proučavanih populacija. Međutim, u IDH lokusu, „a“ alel pokazao se dominantno prisutnim u populacijama *M. avidus*, dok je „b“ alel češće zabeležen u populacijama *M. moenium* (Tabela 13, Slika 17). Stoga su u IDH lokusu utvrđene i statistički značajne razlike u frekvencijama alela između dva taksona ($p \leq 0,01$). U 6 od ukupno 11 analiziranih populacija *M. avidus*, „a“ je bio jedini prisutan alel, dok je isti alel bio major alel (frekvencija $>0,5$) u italijanskoj populaciji Piemonte Cuneo (0,800). Najniža frekvencija navedenog alela detektovana je u populaciji sa Bozdaž planine, Turska (0,200). Major alel za populacije *M. moenium* Đerdap (Srbija), Trento Bleggio Superiore (Italija), Kopaonik (Srbija) i Durmitor (Crna Gora) bio je alel „b“, koji je ujedno bio i fiksiran alel za populacije Orjen (Crna Gora) i Stara Planina (Srbija). U populacijama Fruška Gora (Srbija) i Bologna, Monte Baducco (Italija), „b“ je bio najređe prisutan alel, u poređenju sa ostalim *M. moenium* populacijama. On je, u navedene dve populacije, imao istu frekvenciju (0,5) kao alel „a“ (Tabela 13). U okviru ME lokusa, uočene su statistički značajne razlike u frekvencijama „a“ ($p \leq 0,01$) i „c“ alela ($p \leq 0,05$), između *M. avidus* i *M. moenium*.



Slika 17. Dijagnostički enzimski lokusi za razdvajanje taksona *M. avidus* i *M. moenium*. A-AAT lokus; B-IDH lokus. „a“ i „b“-oznake za alele.

Tabela 13. Frekvencije alela po lokusima i prosečan broj alela po lokusu u pojedinačnim populacijama *M. avidus* kompleksa

Takson					<i>M. avidus</i>			
Popucija		Malinik	Trento S.	Brescia	Piemonte	Bozdaž	Umag(p)	Umag(j)
Lokus	Aleli							
GPD	a	0,223	0,500	0,500	0,625	0,083	0,166	0,500
	b	0,444	-	0,500	0,250	-	0,417	-
	c	0,333	0,500	-	0,125	0,917	0,417	0,500
IDH	a	0,450	1,00	1,00	0,800	0,2	1,00	1,00
	b	0,550	-	-	0,200	0,8	-	-
AAT	a	1,00	1,00	1,00	-	1	1,00	1,00
	b	-	-	-	-	-	-	-
GPI	a	0,333	-	-	-	-	-	-
	b	0,333	-	0,166	-	-	0,500	0,500
	c	0,334	-	0,834	-	-	0,500	0,500
ME	a	-	0,500	-	0,500	0,500	1,00	1,00
	b	1,00	-	-	0,500	0,500	-	-
	c	-	0,500	-	-	-	-	-
A		2,00	1,50	1,50	2,33	1,75	1,60	1,40
Takson					<i>M. avidus</i>			
Populacija		Olimp	Bafa	Evros	Đerdap	Dubašnica		
Lokus	Aleli							
GPD	a	0,200	-	0,500	-	-		
	b	0,100	-	0,125	0,500	-		
	c	0,700	1,00	0,375	0,500	-		
IDH	a	1,00	1,00	1,00	-	0,500		
	b	-	-	-	-	0,500		
AAT	a	1,00	1,00	1,00	-	1,00		
	b	-	-	-	-	-		
GPI	a	0,300	-	-	-	-		
	b	0,300	0,500	-	0,500	-		
	c	0,400	0,500	-	0,500	-		
ME	a	0,400	0,400	0,100	1,00	0,200		
	b	0,400	0,400	-	-	-		
	c	0,200	0,200	0,900	-	0,800		
A		2,20	1,60	1,75	1,67	1,67		

Takson					<i>M. moenium</i>				
Populacija		Derdap	Orjen	F.Gora	Bleggio S.	Bologna	Kopaonik	Durmitor	S. Planina
Lokus	Aleli								
GPD	a	0,500	-	-	-	0,083	0,056	0,300	0,400
	b	0,500	0,300	0,312	0,625	0,500	0,389	0,100	0,100
	c	-	0,700	0,688	0,375	0,4167	0,555	0,600	0,500
IDH	a	0,333	-	0,500	0,250	0,500	0,222	0,125	-
	b	0,667	1,00	0,500	0,750	0,500	0,778	0,875	1,00
	c	-	-	-	-	-	-	-	-
AAT	a	-	-	-	-	-	-	-	-
	b	1,00	1,00	1,00	-	1,00	1,00	1,00	-
	c	-	-	-	-	-	-	-	-
GPI	a	-	-	-	1,00	0,500	0,250	-	-
	b	0,667	1,00	-	0,500	-	0,250	-	-
	c	0,333	-	-	-	0,500	0,500	-	-
ME	a	1,00	0,600	1,00	0,500	0,500	0,500	-	1,00
	b	-	-	-	0,250	0,500	0,500	-	-
	c	-	0,400	-	0,750	-	-	1,00	-
A		1,60	1,40	1,50	1,80	2,00	2,20	1,75	1,67

A-prosečan broj alela po lokusu

p-prolećna generacija, j-jesenja generacija

Tabela 14. Rezultati F statistike za populacije *M. avidus* i *M. moenium*. Istaknute vrednosti ukazuju na značaj lokalnog inbridinga u pojedinim lokusima, kao i na prosečnu Fst vrednost za sve lokuse.

Predmet Analize	<i>M. avidus</i> kompleks (2 meta populacije, <i>M. avidus</i> i <i>M. moenium</i>)			<i>M. avidus</i> kompleks (19 populacija <i>M. avidus/M. moenium</i>)		
	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
GPD	-0,2295	-0,2175	0,0097	-0,5725	-0,0605	0,3256
IDH	0,5917	0,6998	0,2648	0,2687	0,7172	0,6133
AAT	-	1,0000	1,0000	-	1,0000	1,0000
GPI	-0,3233	-0,3105	0,0097	-0,6364	0,4904	0,6886
ME	0,3914	0,4243	0,0540	-0,3048	0,4757	0,5982
pr.vrednost	0,0559	0,2803	0,2378	-0,3643	0,4969	0,6313

Hijerarhijska struktura *M. avidus/M. moenium* para analizirana je upotrebom osnovnih parametara F statistike za čitav kompleks (podeljen u 19 populacija), kao i za isti

kompleks, posmatran kao total-populaciju podeljenu u 2 velike (meta) populacije *M. avidus* i *M. moenium*) (Tabela 14). Pored toga, F statistika je posebno računata za *M. avidus* (11 populacija) i *M. moenium* (8 populacija). Prosečna Fst vrednost, koja predstavlja meru genetičke diferencijacije između populacija, iznosila je 0,571 za *M. avidus* i 0,434 za *M. moenium*. Diferencijacija između *M. avidus* populacija je najvećim delom bila uzrokovana razlikama u frekvencijama alela GPI (Fst=0,678), IDH (Fst=0,664) i ME (Fst=0,585) lokusa, dok je Fst vrednost za GPI lokus iznosila 0,405. Fis vrednosti pokazale su se negativnim za većinu analiziranih lokusa (GPD, IDH and AAT). Pozitivna Fis vrednost u IDH lokusu ukazala je na višak homozigotnosti. Međutim, Fst>Fis relacija, utvrđena u svakom od analiziranih lokusa, uključujući IDH, dovela je do zaključka da ovaj rezultat nije posledica lokalnog inbridinga, već, najverovatnije, genetičkog drifta. Diferencijacija između *M. moenium* populacija bila je većinom uzrokovana razlikama u frekvencijama alela u GPI (Fst=0,701) i ME lokusu (Fst=0,581). I u ovom slučaju su zabeležene negativne Fis vrednosti za sve lokuse, osim za IDH. Međutim, u okviru taksona *M. moenium*, rezultat u IDH lokusu ukazao je na moguć značaj lokalnog inbridinga (Fst < Fis). U svim ostalim lokusima, ova relacija je bila drugačija (Fst>Fis).

Analiza ukupnog *M. avidus/moenium* materijala omogućila je utvrđivanje značajne genetičke diferencije između 19 analiziranih populacija (Fst=0,631) (Tabela 14). Među svim zabeleženim Fis vrednostima, jedina pozitivna vrednost zabeležena je u IDH lokusu, gde je Fst vrednost bila veća od of Fis. Sa druge strane, kada je celokupan uzorak podeljen na dva pretpostavljena kriptična taksona (*M. avidus* i *M. moenium*), Fst < Fis relacija u IDH lokusu ukazala je na inbriding u okviru subpopulacija. Ovo je bio slučaj i u ME lokusu, za isti uzorak. Prosečna Fst vrednost (0,238) ukazala je na primetan nivo genetičke diferencijacije između *M. avidus* i *M. moenium* (meta) populacija (Tabela 14).

Tabela 15 . Frekvencije alela i vrednosti heterozigotnosti po lokusima, u populacijama *M. avidus* i *M. moenium*

Takson		<i>M. avidus</i>	<i>M. moenium</i>
Lokus	Alel		
GPD	a	0,255	0,133
	b	0,255	0,344
	c	0,489	0,523
He		0,637	0,598
Ho		0,723	0,778
IDH	a	0,770	0,256
	b	0,230	0,744
He		0,358	0,385
Ho		1,00**	0,200*
AAT	a	1,00	-
	b	-	1,00
He		-	-
Ho		-	-
GPI	a	0,100	0,167
	b	0,400	0,458
	c	0,500	0,375
He		0,592	0,649
Ho		0,840*	0,750
ME	a	0,337	0,638
	b	0,363	0,224
	c	0,300	0,138
He		0,637	0,533
Ho		0,275**	0,449
Prosečna He		0,452	0,433
Prosečna Ho		0,388	0,435

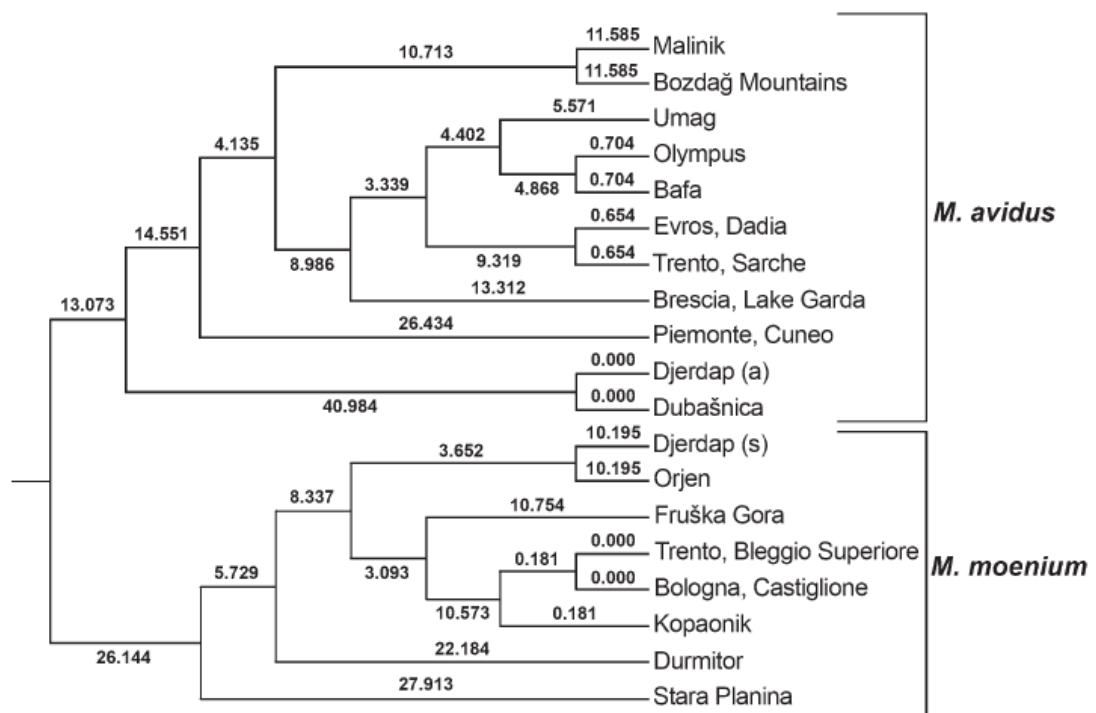
He-očekivana heterozigonost, Ho-uočena heterozigotnost;

** $p \leq 0,01$ i * $p \leq 0,05$, devijacija od Hardi-Vajnbergove ravnoteže upotrebom χ^2 testa.

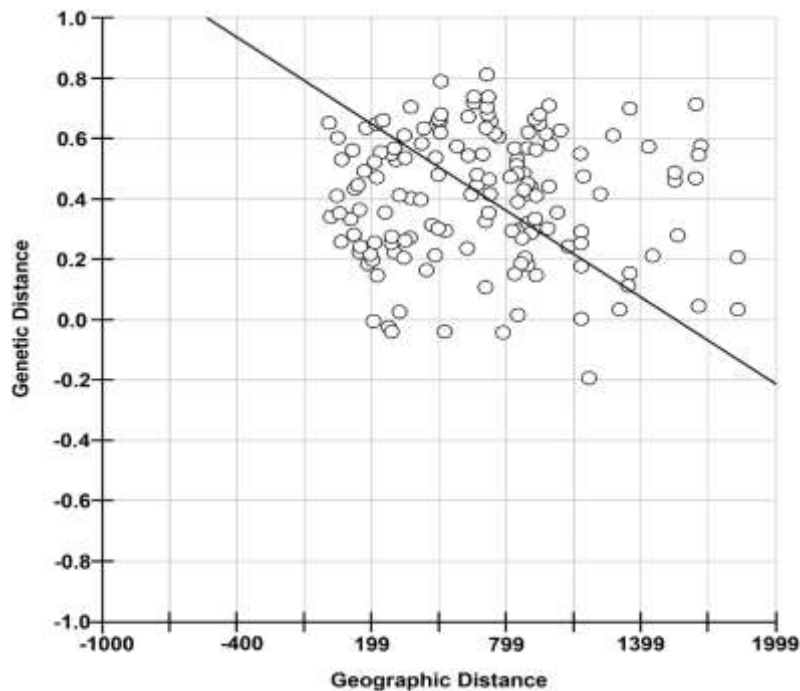
Genetička struktura *M. avidus* i *M. moenium* populacija procenjena je i pomoću vrednosti očekivane (He) i uočene (Ho) heterozigotnosti. Prosečne Ho vrednosti zabeležene za *M. avidus* i *M. moenium* bile su slične i iznosile su 0,452 (*M. avidus*) i 0,433 (*M. moenium*). He vrednost *M. avidus* taksona bila je 0,388, a *M. moenium* taksona 0,435. Ipak, χ^2 test pokazao je da uočene frekvencije genotipova značajno odstupaju od Hardi-Vajnbergove ravnoteže za IDH ($p \leq 0,01$), ME ($p \leq 0,01$) i GPI lokus ($p \leq 0,05$) kod *M.*

avidus-a, kao i za IDH lokus ($p \leq 0,05$) kod *M. moenium*-a (Tabela 15). Analiza distribucije alela kvantifikovana je upotrebom nemodifikovanih mera genetičke bliskosti i genetičke udaljenosti (Nei, 1978). Rezultati su pokazali da je prosečna vrednost genetičke bliskosti (0,520) između *M. avidusa* i *M. moeniuma* bila niža od prosečne vrednosti genetičke udaljenosti (0,646) između ovih populacija. UPGMA dendrogram, kreiran na osnovu genetičke udaljenosti po Nei-u (1978), ukazao je na prisustvo dva odvojena klastera- *M. avidus* klaster i *M. moenium* klaster (Slika 18).

U nastavku je testirana korelacija između F_{st} vrednosti (Weir i Cockerham, 1984) i geografskih udaljenosti, za svaki par od 19 analiziranih populacija. Mantelov test u okviru IBD programa nije otkrio značajnu korelaciju između genetičke i geografske distance ($r = -0,023$) (Slika 19), niti značajnu izolaciju usled distance ($p > 0,05$ na 10.000 randomizacija).



Slika 18. Dendrogram populacija *M. avidus* kompleksa, baziran na genetičkoj udaljenosti po Nei-u (1978). UPGMA metod, modifikovan Neighbour-joining procedurom u okviru programa PHYLIP (verzija 3.5). Vrednosti iznad čvorova predstavljaju dužinu grana. a-jesenja generacija, s-prolećna generacija.

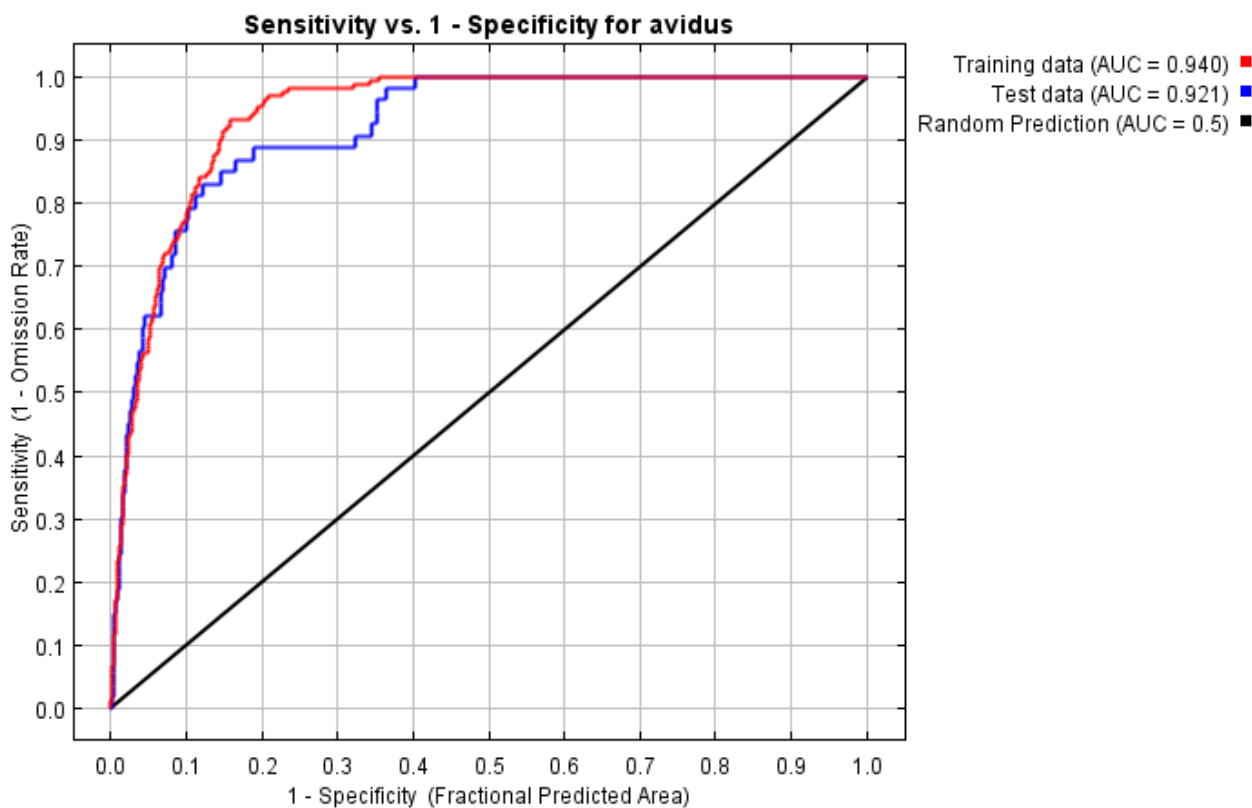


Slika 19. Mantelov test korelacije između F_{st} (Weir i Cockerham, 1984) genetičke udaljenosti i geografske udaljenosti (km).

6.3 Projektovanje i komparacija ekoloških niša taksona

Predviđanje potencijalno pogodnog staništa proučavanih taksona *M. avidus* kompleksa (*M. avidus*, *M. megavidus*, *M. ibericus* i *M. moenium*) pokazalo je visoku stopu uspešnosti, u okviru statističke validacije kreiranog modela. Izgled ROC grafika i visoke AUC vrednosti, ukazali su na visoku prediktivnu sposobnost Maxent modela, kod svih istraživanih taksona (Slika 20, Slike 4a, 4b, 4c-Prilog). AUC vrednosti dobijene na osnovu trening i test podataka iznosile su: 0,940 i 0,921 za *M. avidus*, 0,932 i 0,915 za *M. moenium*, 0,944 i 0,941 za *M. ibericus* i 0,996 za oba seta podataka kod *M. megavidus*. Polazeći od premise da $AUC > 0,9$ odgovara veoma visokom učinku modela (Sweets, 1988), navedeni rezultat ukazuje da je model sa visokom tačnošću razdvojio lokacije na kojima su određene vrste prikazane kao prisutne, od onih na kojima nisu (Pearson, 2010).

Stoga se analizi mapa distribucije dobijenih Maxent-om moglo pristupiti sa velikom pouzdanošću.



Slika 20. ROC grafik za takson *M. avidus* i AUC vrednosti dobijene na osnovu trening i test podataka u Maxent-u.

Statistička validacija modela učvršćena je i binominalnim testom, u okviru samog Maxent-a. Test je omogućio kvantifikaciju vrednosti greške (engl. *omission rate*) razvijenog modela, kroz seriju različitih threshold parametara, na pojedinačnim podacima za sva četiri taksona. Vrednosti greške kretale su se u sledećim rasponima: 0-0,17 za *M. avidus*, 0-0,18 za *M. moenium*, dok je vrednost za *M. megavidus* i *M. ibericus* u svim slučajevima težila nuli. Na osnovu p vrednosti ($p \leq 0,01$), u svim slučajevima i kod svakog od četiri taksona, odbačena je hipoteza da predikcija tačaka prisutnosti nije bolja od nasumične predikcije, na istom području.

Predviđena sadašnja distribucija *M. avidusa* pokazala je da su ekološki najpogodnija područja, sa verovatnoćom prisustva većom od 75%: južna obala Francuske i zapadna

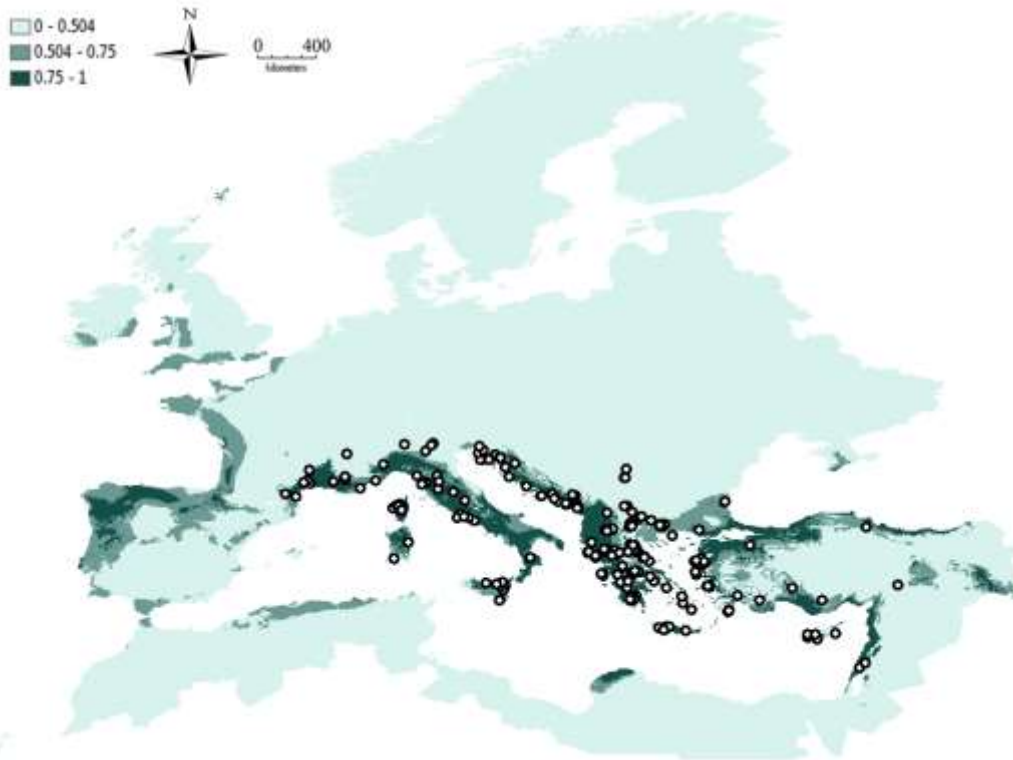
obala Italije (oko Sredozemnog mora), priobalje Jadranskog mora, Peloponez i područje Grčke oko Jonskog mora, priobalna područja Turske prema Egejskom, Crnom i Sredozemnom moru, manja unutrašnja oblast u istočnom delu Turske, granična oblast između Portugala i centralne Španije visine do 1000m (uokvirena planinskim lancima centralne i severne Španije). Zapadna obala Francuske, Portugal, južna obala Španije (pri granici sa Marokom), obala Bugarske, egejska obala Grčke, kao i unutrašnja područja turskih obala, predviđeni su kao relativno pogodni regioni, sa verovatnoćom prisustva od 50-75%. Pojedini regioni Severne Afrike, takođe su rezultovali visokom verovatnoćom pojavljivanja: preko 75% za obalu Sirije i Izraela ka Sredozemnom moru, kao i za malo obalsko područje Libije, te 50-75% za obalu Alžira i Maroka, uz granicu sa Španijom (Slika 21a).

U okviru taksona *M. moenium*, ekološki najpogodnijim (>75%) zabeležena su područja Centralnog francuskog planinskog masiva, francuskih Alpa, severnih Apenina, Dinarskih planina i drugih viših regiona Balkanskog poluostrva, kao i većeg dela oblasti Iberijskog planinskog lanca i Pirineja. Pojedini delovi Iberijskog lanca i Pirineja, niža područja Balkana, područja istočne Francuske i većeg dela Nemačke, zabeleženi su sa verovatnoćom 50-75%. Slična verovatnoća predviđena je i za pojedina obalska područja Skandinavskog poluostrva. Malo područje Turske u blizini Crnog mora, kao i obližnje područje Rusije, pokazalo je istu verovatnoću, uz prisustvo pojedinih tačaka visoke pogodnosti (>75%) (Slika 21b).

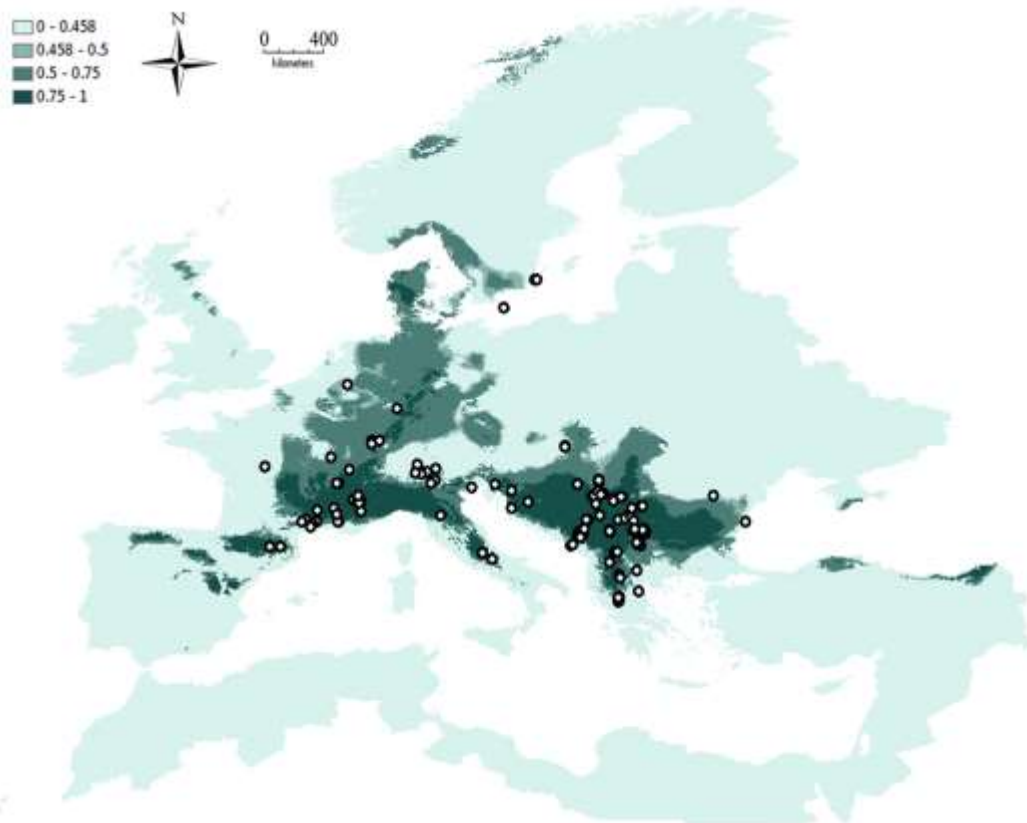
Predviđanje sadašnje distribucije *M. megavidusa* pokazalo je uniformnu sliku, sa izrazito visokom pogodnošću (>90%) za prisustvo ovog taksona na grčkim ostrvima Egejskog i Sredozemnog mora. Visoka verovatnoća prisustva zabeležena je još i na vrlo malim područjima Turske, severne obale Afrike i Sirije (Slika 21c).

Modelovanjem sadašnje distribucije *M. ibericus*, predviđena je veoma visoka pogodnost (>75%) za prisutnost u pojedinim delovima Maroka, Španije i Portugala, sa nešto nižom verovatnoćom prisustva (50-75%) u ostalim delovima ovih država. Verovatnoća pojavljivanja od >75% predviđena je i na sredozemnoj obali Turske i Sirije, kao i na delu alžirske obale i u pojedinim oblastima unutrašnje Turske. Ostali delovi Turske i Sirije, severni Peloponez i grčka obala Jonskog mora, označeni su kao relativno pogodni (50-70%) (Slika 21d).

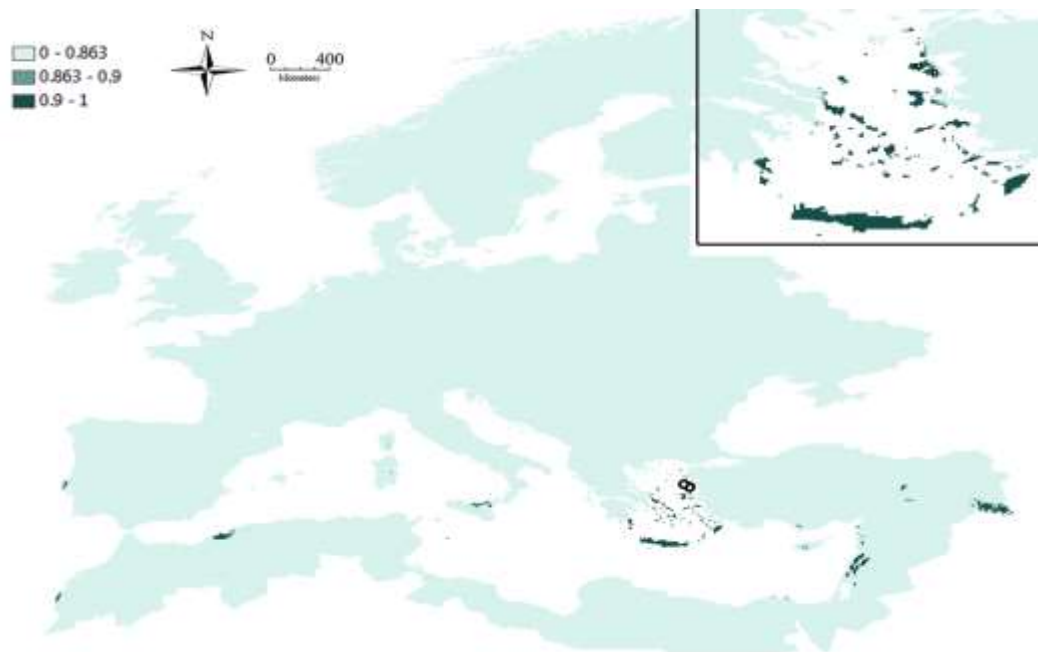
a.



b.



c.



d.

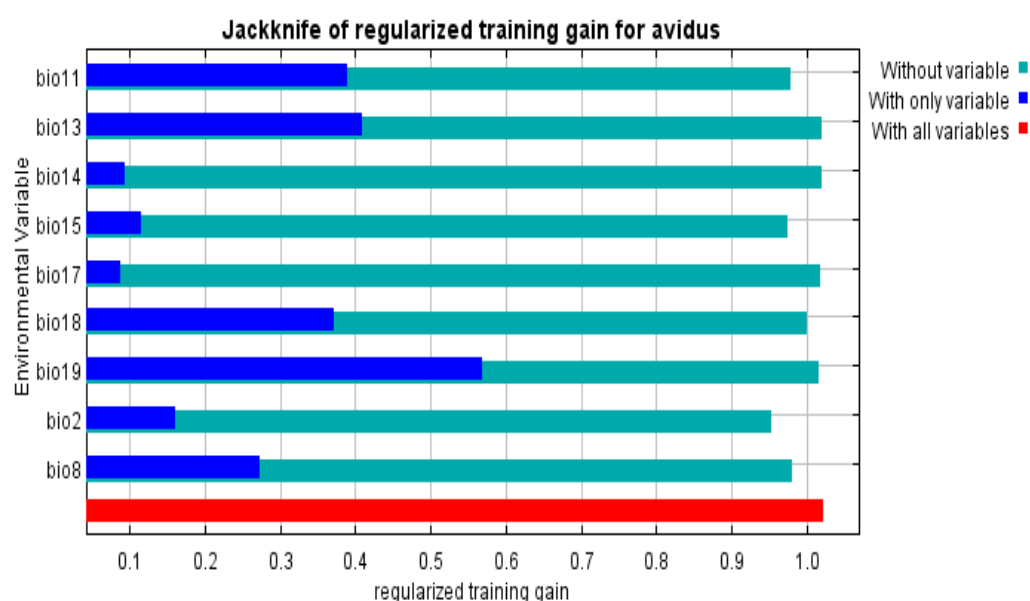


Slika 21. Projekcija ekoloških niša Maxent-a za: a-*M. avidus*, b-*M. moenium*, c-*M. megavidus*, d-*M. ibericus*. Različite nijanse obojenosti odgovaraju različitim procentima verovatnoće potencijalne distribucije vrsta. Tačke predstavljaju unete podatke o prisutnosti svake od vrsta.

U okviru Maxent analize urađen je i jackknife test pojedinačnog doprinosa analiziranih klimatskih varijabli. Procedurom izostavljanja i pojedinačnog testiranja svake od korišćenih varijabli, na uvršćenim trening podacima, dobijen je procenat njenog relativnog doprinosa u finalnom modelu predikcije, za svaku analiziranu vrstu. Varijable sa najvećim relativnim kvantitativnim doprinosom su bile: bio19 (precipitacija u najhladnijem kvartalu) za *M. avidus*, bio14 (precipitacija u najsuvljem mesecu) za *M. moenium* i bio18 (precipitacija u najtoplijem kvartalu) za *M. megavidus* i *M. ibericus* (Tabela 16). Grafički prikaz jackknife procedure omogućio je vizuelizaciju varijabli sa najvećim pojedinačnim doprinosom, koja je kvantitativno nosila najveći deo informacije. Takođe je, za svaku vrstu, detektovana varijabla čije izostavljanje iz modela najviše smanjuje ukupnu uspešnost predikcije, te se mogu smatrati nosiocima specifične informacije, koja odsustvuje u ostalim varijablama (Slika 22; Slika 5-Prilog). Tako je, u slučaju vrste *M. avidus*, pokazano da je varijabla sa najvećim doprinosom u izolaciji od ostalih varijabli bila bio19 (precipitacija u najhladnijem kvartalu), dok je najviše specifičnih informacija nosila varijabla bio2 (srednja vrednost temperaturnog gradijenta) (Slika 22). Za predviđanje distribucije vrste *M. moenium*, najveći pojedinačni doprinos pokazala je varijabla bio17 (precipitacija u najsuvljem kvartalu), dok je izostavljanje varijable bio11 (prosečna temperature u najhladnijem kvartalu), najviše smanjilo uspešnost predikcije (Slika 5a-Prilog). Najveći doprinos u izolaciji za vrstu *M. megavidus* pokazala je varijabla bio15 (sezonska precipitacija), dok je najspecifičnija varijabla bila bio2 (srednja vrednost temperaturnog gradijenta) (Slika 5b-Prilog). Za kreiranje Maxent modela za *M. ibericus*, najveću pojedinačnu informaciju nosila je varijabla bio18 (precipitacija u najtoplijem kvartalu), dok je varijabla bio2 (srednja vrednost temperaturnog gradijenta) imala najviše informacija koje su odsustvovala u ostalim varijablama (Slika 5c-Prilog).

Tabela 16. Relativan doprinos varijabli u kreiranju Maxent modela. Istaknute su varijable sa najvećim relativnim kvantitativnim doprinosom za svaku od vrsta

Varijabla	<i>M. avidus</i>	<i>M. moenium</i>	<i>M. megavidus</i>	<i>M. ibericus</i>
bio2	8,4	6	30,4	22,7
bio8	6,1	1,5	8	13,4
bio11	15,2	19,2	0	0,4
bio13	2,1	2,5	5,3	0
bio14	1,6	39,4	0	5,2
bio15	8,5	3	23,7	1,1
bio17	0,7	23,8	0,1	0
bio18	11,3	3,3	32,6	38,2
bio19	46,1	1,3	0	18,8



Slika 22. Grafički prikaz važnosti pojedinačnih varijabli u Maxent analizi vrste *M. avidus*, dobijen jackknife testom. Dužina tirkiznog polja ukazuje na uspešnost modela pri izostavljanju svake označene varijable, a dužina plavog bolja na uspešnost modela pri korišćenju samo te varijable, pojedinačno.

Test preklapanja ekoloških niša ukazao je na vrlo niske vrednosti preklapanja kod parova taksona u okviru *M. avidus* kompleksa. Najniža vrednost zabeležena je kod para *M. moenium* i *M. megavidus* ($9,74E-06$), dok je najveće preklapanje uočeno između taksona *M. avidus* i *M. ibericus* (0,240). Randomizacioni testovi identičnosti niša ukazali su na to

da se proučavane vrste ne mogu smatrati ekološki ekvivalentnim. Nulta hipoteza o identičnosti ekoloških niša odbačena je na osnovu p vrednosti, koja je ukazala na statistički veoma značajne razlike između svih parova analiziranih vrsta ($p \leq 0,01$) (Tabela 17).

Test sličnosti niša procenio je da su, uz sagledavanje ekološkog okvira svake od analiziranih vrsta, po gotovo svim parovima vrsta, u oba smera, njihove niše sa visokom statističkom značajnošću manje slične, nego što bi se randomizacijom očekivalo. Izuzetak je predstavljalo poređenje niše *M. avidus* sa ekološkim okvirom *M. ibericus*, gde nije utvrđeno signifikantno odstupanje od nulte hipoteze. U svim ostalim slučajevima je, na osnovu p vrednosti, nulta hipoteza o sličnosti ekoloških niša odbačena u intervalu poverenja od 99% (Tabela 17).

Tabela 17. Komparacije ekoloških niša vrsta *M. avidus* kompleksa. Prikazane vrednosti preklapanje niša (D) korišćene su u testovima identičnosti i sličnosti vrsta A i B

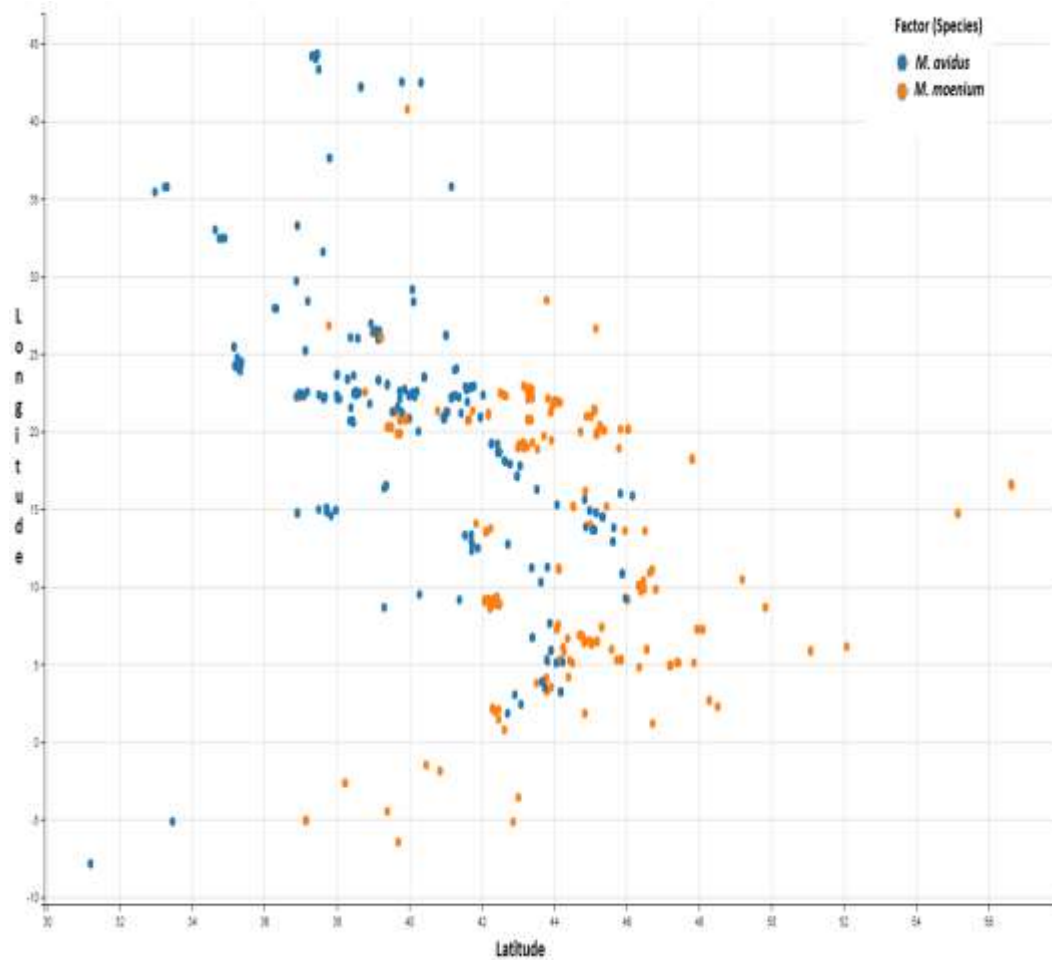
<i>Merodon</i> species		preklapanje niša (D)	test identičnosti	test sličnosti	
A	B			A vs. B	B vs. A
<i>avidus</i>	<i>ibericus</i>	0,240	VR**	NS	MS**
<i>avidus</i>	<i>megavidus</i>	0,0325	VR**	MS**	MS**
<i>avidus</i>	<i>moenium</i>	0,145	VR**	MS**	MS**
<i>moenium</i>	<i>megavidus</i>	9,74E-06	VR**	MS**	MS**
<i>moenium</i>	<i>ibericus</i>	0,001	VR**	MS**	MS**
<i>megavidus</i>	<i>ibericus</i>	0,0133	VR**	MS**	MS**

** ekološke niše su značajno (** $p \leq 0,01$) više različite ili manje slične, nego što se, slučajnošću, očekuje; VR-više različite, MS-manje slične, NS-nije signifikantno

6.4. Određivanje taksonomske pripadnosti jedinki ML tehnikama

6.4.1 Određivanje taksonomske pripadnosti jedinki uz pomoć neuronskih mreža

Modelovanjem predikcije taksonomske pripadnosti analiziranih jedinki taksona *M. avidus* ili *M. moenium* napravljena su dva modela, koja su se razlikovala u korišćenim varijablama: Model 1 (sa geografskom širinom i dužinom lokaliteta uzorkovanja kao varijablom na osnovu koje se vrši predikcija) i Model 2 (sa datumom uzorkovanja jedinki kao varijablom). Svaki od navedenih modela treniran je na dva različita seta podataka, nastalih kroz različite pristupe njihove pripreme i rezultovao je, posledično, različitom uspešnošću predikcije izraženom u procentima. Model 1 postigao je 65,4% pogodaka na setu poznatih podataka, gde je set podataka bio skraćen za sve podatke u kojima je nedostajao podatak o varijabli. Predikcijom odsutnih informacija, na osnovu svih dostupnih podataka u bazi, skraćeni set podataka je proširen na 3.490 jedinki *M. avidus* i *M. moenium*, pri čemu se sposobnost predikcije povećala na 75,5%. Modelovanje geografskom varijablom može se prikazati u formi grafičke disperzije, koja predstavlja vizuelizaciju odvajanja vrsta *M. avidus* i *M. moenium* neuronskom mrežom (Slika 23). Treniranjem na istim setovima podataka, Model 2 pokazao je veću prediktivnu sposobnost. Ona je iznosila 86,8% pri modelovanju na skraćenoj bazi, dok je, modelovanjem na bazi proširenoj predikcijom inicijalno odsutnih informacija, tačna determinacija postignuta u 87,8% slučajeva.



Slika 23. Grafički prikaz razdvajanja jedinki *M. avidus* i *M. moenium*, kao rezultat modelovanja taksonomske pripadnosti jedinki u skraćenoj bazi, upotrebom neuronske mreže, na osnovu geografskih koordinata uzoraka.

6.4.2 Određivanje taksonomske pripadnosti jedinki GBM tehnikom regresionih stabala

Ideja modelovanja predikcije taksonomske pripadnosti jedinki realizovana je i kroz busting MLe tehniku regresionih stabala. Kao i u radu sa neuronskom mrežom, testirane su prediktivne sposobnosti dva modela, zavisno od varijable korišćene u njegovom kreiranju, da izvrše tačnu determinaciju pojedinačnog uzorka u bazi kao *M. avidus* ili *M. moenium*. Zahvaljujući sposobnosti regresionih stabala da rade i sa sirovim bazama podataka, uprkos eventualnom odsustvu informacija, modelovanje GBM metodom izvršeno je kroz tri seta podataka: sirovu bazu, kao i kroz dva seta korišćena i u modelovanju neuronskom mrežom (skraćena baza i baza popunjena surogatnim podacima). Rezultat navedene tehnike dobijen je u vidu matematičke Log Loss vrednosti. Iako sirove Log Loss vrednosti nisu jednostavne za tumačenje, one su pogodna mera za komparaciju različitih modela, pri čemu manja vrednost ukazuje na bolju uspešnost predikcije (Rosasco i sar., 2004; Masnadi-Shirazi i Vasconcelos, 2014). Model 1 (determinacija jedinke na osnovu geografske širine i dužine lokaliteta, kao geografske varijable) rezultovao je sledećim vrednostima: 0,894 za model kreiran na sirovim podacima, 0,831 za model kreiran na skraćenoj bazi i 0,941 za model kreiran na bazi popunjenoj surogatnim podacima. Model 2 (determinacija jedinke na osnovu datuma uzorkovanja, kao vremenske varijable) rezultovao je uspešnijom prediktivnom sposobnošću kroz navedene setove podataka, pri čemu su vrednosti iznosile: 0,695 pri modelovanju na podacima iz sirove baze, kao i na podacima iz skraćene baze i 0,694 za modelovanje na bazi u kojoj su odsutni podaci automatski popunjavani surogatnim.

7. DISKUSIJA

Nakon prvih zabeleženih podataka o genetičkoj strukturiranosti *M. avidus* kompleksa (Milankov i sar., 2001; Mengual i sar., 2006; Marcos-García i sar., 2007; Milankov i sar., 2009; Ståhls i sar., 2009), ukazano je na neophodnost njegove detaljne analize na području Evrope, kako bi se sa sigurnošću utvrdio broj kriptičnih taksona i stekla slika o njima (Speight, 2015). Ranija istraživanja *Merodon avidus* kompleksa ukazala su na to da je široko rasprostranjena vrsta *Merodon avidus* zapravo geografski i genetički strukturiran takson, koji obuhvata najmanje dva kriptična taksona. Zabeležene morfološke razlike u kombinaciji sa analizom alozimske varijabilnosti i fiksiranim razlikama u dva dijagnostička enzimska lokusa (AAT i IDH) ukazala su na prisustvo taksona *Merodon avidus* A (populacije Mediterana i centralnog dela Balkanskog poluostrva) i *Merodon avidus* B (populacije planinskih područja Balkanskog poluostrva) (Milankov i sar., 2001). Naredne studije bazirane na populacijama iz Španije (Mengual i sar. 2006, Marcos-García i sar. 2007, Milankov i sar. 2009) i Grčke (Ståhls i sar., 2009) ukazale su na prisustvo još kriptičnih vrsta u okviru *M. avidus* kompleksa. Milankov i sar. (2001) zabeležili su genetičke razlike i između prolećnih mediteranskih populacija (*M. avidus* A) i planinskih populacija (*M. avidus* B), koje su morfološki bile gotovo nerazdvojive. Međutim, uočena simpatrija pojedinih populacija *M. avidus* A i B otežala je dalje rešavanje taksonomskih pitanja *M. avidus* kompleksa. Fenotipske razlike između prolećne/rano-letnje generacije (maj-jun) i kasno-letnje/jesenje generacije (juli-septembar) mediteranskih populacija ukazale su na moguću genetičku diferencijaciju između konspecijskih *M. avidus* A populacija i otvorile nova pitanja o njihovom taksonomskom statusu. Ovo istraživanje bilo je ograničeno uskim geografskim područjem uzorkovanja, te su uočene varijacije označene kao intraspecijske.

Raniji rezultati bazirani na COI mtDNK sekvencama u okviru barkoding pristupa, doveli su do daljih nedoumica u pogledu taksonomije *M. avidus* kompleksa. Sekvenciranje 3'COI regiona mitohondrijalne DNK otkrilo je visoku varijabilnost haplotipova, ali navedeni marker nije uspeo da razdvoji evoluciono nezavisne genetičke entitete, prethodno identifikovane kao *M. avidus* A i *M. avidus* B (Milankov i sar., 2009; Popović i sar., 2014). Sa druge strane, uočena su tri jedinstvena haplotipa kod morfološki nerazdvojivih primeraka vrste *M. ibericus* (prvobitno opisanih kao *Merodon bicolor*, Milankov i sar.,

2009), ali je navedeni zaključak bio baziran na svega tri analizirana primerka navedene vrste.

U odnosu na sve prethodne genetičke studije ove grupe, ovo istraživanje je obuhvatilo daleko veći broj jedinki i populacija, uzorkovanih sa značajno šireg geografskog područja (sa teritorije Evrope, male Azije i severne Afrike) i bazirano je na integrativnoj upotrebi nekoliko metoda. Na ovaj način, omogućen je jasniji kvalitativni i kvantitativni prikaz genetičkog diverziteta analiziranog kompleksa i u njemu prisutnih kriptičnih vrsta, sa ciljem da se doprinese konačnom razjašnjenju statusa taksonomski izazovne grupe organizama i pitanja otvorenih prethodnim analizama.

Podaci o tome da jedinke vrsta *M. avidus* (ranije *M. avidus* A) i *M. moenium* (ranije *M. avidus* B) dele deo svog geografskog areala bili su praćeni zapažanjem da je, na kontinentalnim lokalitetima, njihovo sinhrono ko-egzistiranje onemogućeno različitim temperaturnim preferencijama (*M. moenium* javlja se kao prolećno-letnja, a *M. avidus* kao letnje-jesenja generacija) (Vujić, usmeno). Najnovija terenska istraživanja otkrila su da se, na ostrvima Korzika (Francuska) i Krf (Grčka), vrste iz ovog kompleksa javljaju u simpatriji i sinhroniji, ali sa izraženim sklonostima ka različitim mikrostaništima. Otkriće simpatrijskih jedinki *Merodon avidus* kompleksa, sa temporalnim preklapanjem, otvorilo je novo polje i pitanja u daljem rasvetljavanju genetičke i ekološke strukture ispitivanog kompleksa vrsta. Morfološke karakteristike jedne jedinke, tipične za vrstu *M. moenium*, kao i njena vremenska koegzistencija sa vrstom *M. avidus*, skrenuli su pažnju na jedinku FSUNS 16536 sa ostrva Korzika. Genetičke analize tri seta sekvenci mitohondrijalne DNK ukazale su na to da navedena jedinka deli haplotipove sa vrstom *M. avidus* sa Korzike, kao i sa jedinkama *M. moenium* sa Balkanskog poluostrva. Ova jedinka je, kroz sve filogenetičke pristupe, svrstana u klaster sačinjen od jedinki *M. avidus* i *M. moenium*, na osnovu čega je zaključeno da nije reč o genetički novom taksonu, već da navedena jedinka pripada vrsti *M. moenium*.

Prezentovani rezultati analize DNK sekvenci od izuzetnog su značaja zbog ukazivanja na postojanje još jednog kriptičnog taksona, *M. aff. moenium*, detektovanog kroz populaciju sa ostrva Krf i jedinke sa poluostrva Peloponez i ostrva Evia. Kroz svaku od sprovedenih filogenetičkih metoda, jedinke sa ostrva Krf (morfološki identifikovane kao *M. moenium*, sa jedinstvenim fenomenom vremenske i prostorne ko-egzistencije sa vrstom *M. avidus*) izdvojile su se, zajedno sa dve jedinke sa Peloponeza i jednom jedinkom sa

Evie, kao zaseban genetički entitet. Ovo je podržano i rezultatima AMOVA analize, gde vrednosti Φ statistike jasno podupiru pretpostavku o genetičkoj diferencijaciji taksona *M. aff. moenium* u odnosu na sve pretpostavljene vrste *M. avidus* kompleksa. Dobijene Φ_{st} vrednosti kretale su se između 0,655 (diferencijacija između vrste *M. aff. moenium* i *M. avidus* u 5' COI regionu) i 0,963 (diferencijacija između vrste *M. aff. moenium* i *M. megavidus* u 3' COI regionu), što približno odgovara intervalu Φ_{st} vrednosti dobijenim poređenjem vrste *M. megavidus* sa ostalim vrstama kompleksa. Navedene vrednosti u vezi sa vrstom *M. aff. moenium* znatno su više od Φ_{st} vrednosti koje ukazuju na genetičku diferencijaciju između vrsta *M. avidus* i *M. moenium* (0,175; 0,146; 0,140; za tri seta sekvenci), što ukazuje na to da se novootkrivena vrsta *M. aff. moenium*, u evolucionoj istoriji, izdvojila pre *M. avidus* i *M. moenium* linije. Ovo je dovelo i do jače rezolucije korišćenog COI markera kod ove vrste i rezultovalo njihovim uspešnim izdvajanjem u klastere u filogenetičkim stablima. Sa druge strane, niže Φ_{st} vrednosti između *M. avidus* i *M. moenium* vrsta u skladu su sa pretpostavkom o njihovom skorijem razdvajanju. Ostrvski karakter staništa novog *M. aff. moenium* taksona sugeriše da je u pitanju kriptična ostrvska vrsta, čija se specijacija najverovatnije odigrala kao posledica geografske izolovanosti od drugih populacija i vrsta *M. avidus* kompleksa, u uslovima sličnih selektivnih pritisaka i sličnih ekoloških karakteristika ovih staništa. U istraživanju kriptične specijacije u okviru kompleksa *Merodon luteomaculatus*, autori su pretpostavili da je geološka istorija Egejskog arhipelaga (pre svega, promene u nivou mora tokom Pliocena i Pleistocena i izolacija u različite glacijalne refugijume tokom Pleistocena) odgovorna za fragmentaciju staništa i diverzifikaciju taksona sa navedenog područja (Radenković i sar., 2018a). Autori navode da je najznačajniji paleoistorijski događaj u Egejskom arhipelagu formiranje srednjo-egejskog morskog useka (engl. *Mid-Aegean trench*) kao fizičke barijere, koja je dovela do odvajanja zapadnih i istočnih egejskih ostrva, što je rezultovalo razlikama u distribuciji i diverzitetu genetičkih haplotipova. Kroz ilustraciju potencijalne specijacije kriptičnih taksona, istaknuto je da su odvajanje severnih od južnih Ciklada, njihovo odvajanje od glavne kopnene mase, kao i odvajanje poluostrva Peloponez od glavnog kopna, događaji koji su, praćeni genetičkim driftom i ograničenim protokom gena između fragmentisanih rezervoara gena, usloveli odvajanje pojedinih vrsta od zajedničkog pretka (Radenković i sar., 2018a). S obzirom na to da trenutno ustanovljen areal vrste *M. aff. moenium*, pored ostrva Krf, obuhvata upravo Peloponez i egejsko ostrvo Ios (arhipelag Ciklada), vrlo je moguće da su navedeni procesi doprineli i odvajanju *M. aff. moenium* od ostalih vrsta *M. avidus* kompleksa. Otkriće ove vrste još jednom je potvrdilo primenjivost

mitohondrijalnog COI markera u identifikaciji kriptičnih taksona u okviru roda *Merodon* i ukazalo na mogućnost postojanja još kriptičnih taksona, na drugim ostrvskim lokalitetima sličnog podneblja. Stoga bi, sa aspekta proučavanja biodiverziteta, ali i ekološkog menadžmenta endemskih vrsta, značajnu pažnju trebalo posvetiti ovakvim lokalitetima, naročito u slučajevima primećene istovremene aktivnosti jedinki različitih vrsta.

Istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom rasvetlila su pitanje taksonomskog statusa taksona *Merodon hikmeti*. Na osnovu holotipa uzorkovanog na visokim planinama istočne Turske, Hurkmans i Hayat (1997) su izneli pretpostavku o postojanju nezavisnog genetičkog entiteta na ovom području. U skladu sa ovom hipotezom, 18 jedinki odgovarajućih morfoloških karaktersitika, sa područja Grčke i Turske, označeno je, u preliminarnim genetičkim analizama ovog istraživanja, kao *M. hikmeti*. Dobijena NJ, ML i MP filogenetička stabla, kao i AMOVA rezultati, opovrgli su, međutim, ovu hipotezu. Navedene jedinice grupisane su u klastere zajedno sa vrstama *M. avidus* i *M. moenium*, a rezultati Φ statistike ukazali su na to da navedene jedinice, u najvećem broju, pripadaju vrsti *M. avidus*. Φ_{st} vrednosti bile su statistički značajne za parove *M.hikmeti/M. ibericus*, *M. hikmeti/M. megavidus*, *M. hikmeti/M. moenium* i *M. hikmeti/M. aff. moenium*, u oba analizirana COI fragmenta, sugerišući postojanje značajne genetičke diferencijacije kod navedenih taksona. Nasuprot tome, nije utvrđena značajna genetička diferencijacija između taksona *M. hikmeti* i *M. avidus*, na osnovu 3' COI ($\Phi_{st}=0,037$) i 5' COI sekvenci ($\Phi_{st}=0,066$). Pored toga, analiza ukupne COI sekvence rezultovala je odsustvom statistički značajne genetičke diferencijacije ne samo između *M. hikmeti* i *M. avidus* ($\Phi_{st}=0,013$), već i između *M. hikmeti* i *M. moenium* ($\Phi_{st}=0,051$) taksona. U skladu sa dobijenim rezultatima, zaključeno je da nema osnova da se *M. hikmeti* posmatra kao zasebna vrsta. S obzirom da dokumentovani holotip ima sve morfološke i ekološke karakteristike vrste *M. moenium*, naziv *M. hikmeti* trebalo bi ubuduće smatrati sinonimom vrste *M. moenium*, koja, planinskim lokalitetom istočne Turske sa koje je holotip, dobija areal koji do sada nije bio poznat. Jedinice označene prvobitno kao *M. hikmeti*, pregrupisane su, većinom, u vrstu *M. avidus*, dok je jedna jedinka sa područja Turske (aktivna u julu mesecu) pregrupisana u vrstu *M. moenium*. Tako determinisane jedinice uvrštene su u finalne genetičke analize ove disertacije.

DNK analize ove disertacije doprinele su integrativnom taksonomskom pristupu razdvajanja kriptičnih vrsta *M. avidus* kompleksa, upotrebom 3' i 5' fragmenata citohrom c-oksidaza I (COI) gena. Navedene sekvence predstavljaju marker sa opšte prihvaćenom

ulogom barkoda u barkoding pristupu, koji je, od strane različitih autora, sugerisan u cilju identifikacije vrsta (Hebert i sar., 2003; Tautz i sar., 2003; Gaston i O'Neill, 2004). Uprkos tome, kod nekih vrsta familije Syrphidae zabeleženi su slučajevi niske ili, čak, odsustva varijabilnosti COI sekvenci. Mengual i sar. (2008) beleže razlike između morfoloških i DNK podataka, gde su morfološke razlike praćene identičnim COI sekvencama. U okviru istraživanja obuhvaćenog ovom disertacijom, upotreba oba fragmenta COI gena, kao i sekvence kreirane njihovim spajanjem, dovela je do zanimljivih zapažanja. Molekularne filogenetičke analize prezentovane kroz NJ, ML, MP i Bajesova stabla prikazale su prisustvo tri odvojene klade, koje odgovaraju vrstama *M. megavidus*, *M. ibericus* i do sada nepoznatom *M. aff. moenium* taksonu, sačinjenom od jedinki sa grčkih ostrva Krf, Peloponez i Evia (Slike 7-15). Jedinke preliminarno označene kao *Merodon megavidus*, uzorkovane na ostrvu Samos, genetički su potvrđene kao pripadnici navedene vrste. Na ovaj način, redefinisana je areal vrste *M. megavidus*, do sada posmatrane isključivo kao endem ostrva Lezbos. Nasuprot jedinki *M. megavidus* i *M. ibericus*, jedinke *M. avidus* i *M. moenium*, odnosno, haplotipovi ovih taksona, grupisani su zajedno. Stoga je jasno da rezultati DNK barkodinga pružaju podršku hipotezi o tome da *M. ibericus* i *M. megavidus* predstavljaju posebne vrste proučavanog kompleksa, ali ne uspevaju da razdvoje potencijalne vrste *M. avidus* i *M. moenium*. Uprkos tome, rezultati AMOVA analize bazirani na genetičkoj varijabilnosti analiziranih sekvenci, potvrdili su prisustvo značajne genetičke diferencijacije između vrsta *M. avidus* i *M. moenium*. Za sva tri analizirana seta sekvenci, izračunate Φ_{st} vrednosti bile su statistički veoma značajne ($p < 0,01$), u svakom od analiziranih parova vrsta, što je bilo u skladu sa polaznom pretpostavkom da *M. megavidus*, *M. ibericus*, *M. avidus* i *M. moenium* predstavljaju posebne vrste u okviru kompleksa. Razdvajanje vrsta *M. avidus* i *M. moenium* dodatno je potvrđeno kroz analizu varijabilnosti dijagnostičkih enzimskih lokusa, kao i kroz analizu njihovih ekoloških niša, prikazanih u odgovarajućim poglavljima ove disertacije. Za blisko srodne vrste, koje su se skoro razdvojile, postoje dokumentovani podaci o otežanoj delineaciji upotrebom DNK barkodinga, uz napomenu da se broj mutacija COI lokusa, koje razdvajaju dve individue, akumulira tokom vremena (Austerlitz i sar., 2009). Pretpostavka o skoroj diferencijaciji *M. avidus* i *M. moenium* od zajedničkog pretka objasnila bi deljene COI haplotipove između navedenih taksona, dokumentovane od strane Milankov i sar. (2009) i Popović i sar. (2014), koji su zabeleženi i u ovom istraživanju. Prikazani deljeni haplotipovi između vrsta *M. avidus* i *M. moenium* u oba analizirana COI fragmenta (5' i 3'), smanjili su doprinos ovog markera u filogenetičkim analizama dveju vrsta, te onemogućili njihovo razdvajanje u

klustere. Osim kroz skorbu specijaciju ovih vrsta, niska rezolucija COI markera u navedenom slučaju se može objasniti i efektom osnivača povezanim sa postglacijalnom rekolonizacijom severne Evrope (Schikano i sar., 2010). Ačanski i sar. (2016a) izneli su hipotezu da je najverovatniji scenario postglacijalne kolonizacije navedenih vrsta bila ekspanzija linija *M. avidus* i *M. moenium* sa Balkanskog poluostrva (refugijuma) ka centralnoj Evropi (engl. „a grasshopper pattern”, Hewitt (1999)). Autori su procenili da se prvo mitohondrijalno odvajanje u kompleksu odigralo u ranom Pleistocenu (pre oko 800.000 godina-odvajanje *M. ibericus* od zajedničkog pretka), dok divergencija *M. megavidusa* približno odgovara Günz-Mindel-ovoj interglacijaciji od *M. avidus/M. moenium* linije. Najskorija divergencija, između *M. avidusa* i *M. moeniuma*, verovatno se odigrala tokom Riss-Würm interglacijacije i početkom Würm glacijalnog perioda (Ačanski i sar., 2016a). Polazeći od navedenog scenarija postglacijalne ekspanzije, pretpostavlja se da su geografske barijere u vidu masivnih planinskih lanaca na obodu Iberijskog poluostrva (stanište današnje vrste *M. ibericus*), kao i ostrvska izolacija staništa današnje vrste *M. megavidus*, sprečili njihovu postglacijalnu kolonizaciju Evrope, te doprineli ranijem razdvajanju navedenih vrsta. Ovo je rezultovalo u snažnijoj moći razdvajanja COI DNK markera kod vrsta *M. ibericus* i *M. megavidus* nego kod vrsta *M. avidus* i *M. moenium*.

Kako bi se prevazišla nemogućnost razdvajanja taksona *M. avidus* i *M. moenium* u klustere upotrebom barkod sekvence, u ovo istraživanje uključeni su biohemijski markeri. Analiza alozimske varijabilnosti u okviru ovog istraživanja otkrila je prisustvo alela specifičnih za vrstu u AAT lokusu i statistički veoma značajne razlike u frekvenciji alela IDH lokusa (svaki od alela je bio dominantno prisutan u svakoj od označenih vrsta). Ovo je u delimičnom skladu sa prethodnom enzimskom studijom na ovim vrstama, koja je ukazala na prisustvo fiksiranih alela u svakom od kriptičnih taksona IDH lokusa, dok AAT aleli nisu bili u potpunosti fiksirani (zajednički alel imao je frekvenciju 1,00 u populaciji *M. avidus* A, a 0,083 i 0,09 u dve populacije *M. avidus* B) (Milankov i sar., 2001). Na osnovu rezultata ove disertacije, može se potvrditi da IDH i AAT predstavljaju visoko dijagnostičke enzimske lokuse, koji se mogu koristiti u razdvajanju dva kriptična taksona *M. avidus* i *M. moenium*. Zabeležene razlike u prisustvu i frekvenciji alela, u odnosu na ranije studije, protumačene su kao posledica šireg geografskog područja uzorkovanja u ovom istraživanju (pored primeraka sa Balkanskog poluostrva, u analizu su uključene i jedinke sa Apeninskog poluostrva i iz Turske), čime je i povećana pouzdanost dobijenih

rezultata. Izračunata F_{st} vrednost po Wright ($F_{st}=0,631$) potvrdila je prisustvo dva taksona, što je u skladu sa prethodno dobijenom vrednošću od 0,511 (Milankov i sar., 2001).

Dominacija $F_{st} > F_{is}$ relacije u okviru F statistike ukazala je na, ukupno gledano, veći efekat genetičkog drifta u odnosu na lokalni inbriding. Međutim, različite F_{st} vrednosti po različitim analiziranim lokusima, ukazuju na to da genetički drift i protok gena verovatno nisu bili glavni uzročnici genetičke diferencijacije analiziranih populacija. Može se pretpostaviti da su dominantan mehanizam ovog procesa bili različiti selekcionni pritisci u okruženju *M. avidusa* i *M. moeniuma*, ne samo na različitim geografskim područjima, već i na istom staništu.

U cilju dobijanja što preciznije genetičke informacije o genetičkoj diferencijaciji proučavanih taksona, ovom prilikom, analizirane su nezavisno i dve velike meta populacije, *M. avidus* i *M. moenium*. Vrednosti koeficijenta genetičke bliskosti (I) i udaljenosti (D) po Nei-ju bile su od značaja za razrešavanje taksonomskog pitanja navedenih kriptičnih vrsta. Highton (2000) navodi da D vrednosti po Nei-ju, izračunate na osnovu uočene alozimske varijabilnosti populacija, mogu ukazati na to da li je reč o intra- ili inter-specijskim komparacijama. Po ovom autoru, kod grupa među kojima je $D > 0,15$, radi se, najverovatnije, o poređenjima između dve vrste. Nasuprot tome, niže D vrednosti predstavljaju indiciju intra-specijske komparacije. Koeficijent genetičke udaljenosti (D) između meta-populacija *M. avidus* i *M. moenium*, dobijen na osnovu analize alozimske varijabilnosti u ovom istraživanju, iznosio je 0,646, što je znatno iznad granice koju navodi pomenuti autor. Time je stečena jasna indicija da *M. avidus* i *M. moenium* ne pripadaju istoj vrsti. Koeficijent genetičke bliskosti (I) između meta-populacija *M. avidus* i *M. moenium* iznosio je 0,520 i pružio dublji uvid u taksonomsku relaciju navedenih kriptičnih vrsta. Na osnovu slične vrednosti navedenog koeficijenta kod sestrinskih vrsta *Drosophila willistoni* grupe (Diptera: Drosophilidae) $\bar{I}=0,517 \pm 0,024$, zaključeno je da *M. avidus* and *M. moenium* najverovatnije predstavljaju sestrinske vrste. Ovo je u skladu sa premisom da su sestrinske vrste reproduktivno izolovane, ali često morfološki nerazdvojive (Steyskal, 1972). Njihova reproduktivna izolacija je posledica činjenice da se sestrinske vrste mogu ukrštati, ali se njihovo potomstvo ne može dalje reprodukovati. Istovremeno, mogućnost njihovog ukrštanja mogla bi objasniti povremeno prisustvo drugih alela u enzimskim lokusima specifičnim za vrstu, koje je zabeleženo u ovom, kao i u prethodnim istraživanjima enzimske varijabilnosti ovih taksona. Sve navedeno ukazuje na to da se *M. avidus* kompleks, pored iberijskog taksona *M. ibericus*, ostrvskog taksona *M. megavidus*,

kao i novog ostrvskog taksona *M. aff. moenium*, sastoji od još dve sestrinske vrste. Time je potvrđena ključna i osnovna hipoteza ove disertacije i opravdana inicijalna odluka za uvođenje i upotrebu različitih imena za navedene vrste. Nakon sretanja sa različitim nazivima za pojedine kriptične taksone, u različitim publikacijama, ovo istraživanje, pozivajući se na genetičku karakterizaciju proučavanog kompleksa vrsta, sugerše sinhronizovanu upotrebu sledećih naziva, u skladu sa pravilima Internacionalnog kodeksa zoološke nomenklature: *Merodon avidus* Rossi, 1790; *Merodon moenium* Wiedemann, 1822; *Merodon ibericus* Vujić 2015. i *Merodon megavidus* Vujić i Radenković, 2016.

Populacija sa Fruške gore (Panonska nizija, Srbija) predstavljala je jednu od 19 populacija, uključenih u analizu alozimske varijabilnosti *M. avidus* kompleksa. Na osnovu dobijenih rezultata, dendrogram baziran na vrednostima genetičke udaljenosti, pokazao je da navedene populacije pripadaju *M. moenium* klasteru, što je u suprotnosti da zaključkom iz 2009. godine (Milankov i sar., 2009). Uzimajući u obzir morfološke i geografske aspekte, populacije sa Fruške gore odgovaraju ostalim populacijama iz Panonske nizije, koje sve pripadaju vrsti *M. moenium*.

Mofološke analize oblika krila u istraživanjima Milankov i sar. (2009) nisu uspele da razdvoje sve taksone, koje je bilo moguće razdvojiti dijagnostičkim alozimima. Takođe, u pogledu oblika krila, pronađena je visoka stopa sličnosti između alopatrijskih metapopulacionih parova *M. avidus* A i B, dok su se populacije *M. avidus* A iz Panonske nizije i Makedonije preklapale sa *M. avidus* B populacijama sa Durmitora, Stare planine i Kopaonika (Milankov i sar., 2009). S obzirom na to da su UPGMA dendrogram iz ovog istraživanja i UPGMA fenogram iz najnovijih analiza oblika krila i surstilusa (Ačanski i sar., 2016a) prikazali nedvosmisleno grupisanje svih populacija *M. avidusa* i *M. moenium* u dva odvojena klastera, može se zaključiti da su navedena podudaranja bila posledica greške u preliminarnoj identifikaciji vrsta, nastaloj usled morfoloških sličnosti između prolećne generacije *M. avidus* i *M. moenium*.

Centralni deo ovog istraživanja bila je determinacija potencijalnih veza između morfologije, genetičkih podataka i sezonskih preferencija određenih populacija *M. avidus* kompleksa. Dva lokaliteta od ključnog značaja za rešavanje navedenih pitanja bili su Đerdap (kontinentalni lokalitet) i Umag (mediteranski lokalitet na obali Jadranskog mora). Na osnovu pretpostavke o sezonskoj aktivnosti ispitivanih vrsta, na lokalitetima gde se pojavljuju zajedno, prolećne jedinke sa Đerdapa preliminarno su identifikovane kao *M.*

moenium, a jedinke jesenje generacije kao *M. avidus*. UPGMA dendrogram baziran na alozimskim podacima svrstao je prolećnu generaciju jedinki u *M. moenium* klaster, a jesenju u *M. avidus* klaster, što odgovara inicijalnoj determinaciji ovih uzoraka (Slika 18). Ovim je potvrđeno prisustvo temporalne diferencijacije *M. avidus* i *M. moenium* na istom lokalitetu i opravdana upotreba ove informacije u tačnoj identifikaciji morfološki sličnih primeraka. Pored toga, navedena pojava ukazuje na mogućnost da su razlike u sezonskim afinitetima pojedinih populacija mogle dovesti do postojećih genetičkih razlika između sestrinskih vrsta.

Fokusirajući se na tipične mediteranske karakteristike klime koja vlada na području Umaga, prolećna i letnja populacija identifikovane su kao *M. avidus*, uprkos prisustvu manjih morfoloških razlika. Uzorkovanje dve generacije, pretpostavljeno jednog taksona, na istom lokalitetu, izvršeno je sa ciljem da se razjasni da li postoji genetička poddiferencijacija između *M. avidus* populacija, kao što je prethodno (usled relativno visoke intraspecijske divergencije i fenotipske substrukturiranosti u okviru ovog taksona) pretpostavljeno (Milankov i sar., 2004, 2009). U probnom uzorku, dve generacije obeležene su kao odvojene populacije i kao takve uključene u analizu genetičke udaljenosti. Rezultujući UPGMA dendrogram grupisao je obe populacije u jedan klaster u okviru velikog *M. avidus* klastera. Koeficijent genetičke bliskosti po Nei-ju iznosio je 0,99. Ovim je potvrđeno postojanje kontinuiranog godišnjeg prisustva vrste *M. avidus* na lokalitetima sa mediteranskom klimom, što je od izuzetnog značaja za ispravnu identifikaciju jedinki *M. avidus* kompleksa. Činjenica da obe populacije pripadaju istoj vrsti ukazala je na to da su morfološke razlike između populacija iz Umaga uzorkovanih tokom različitih sezona verovatno posledica varijacija u ekološkim uslovima tokom razvojnih stadijuma insekata (Popović i sar., 2015). Takođe, njihovo grupisanje u najbliži klaster, kao i visoka vrednost koeficijenta genetičke sličnosti između njih, ukazali su na to da, na ovom lokalitetu, nije prisutna genetička strukturiranost u okviru vrste *M. avidus*. S obzirom na navedeni zaključak, u finalnoj analizi alozimske varijabilnosti, obe generacije (iz juna i septembra) *M. avidus* populacije iz Umaga grupisane su u jednu populaciju (Slika 18).

Današnja distribucija velikog broja vrsta insekata oblikovana je još tokom geološke epohe Pleistocena, za koju su bile karakteristične klimatske oscilacije i smene glacijacija sa interglacijalnim ciklusima (Fink i Kukla, 1977; Martinson i sar., 1987; Perissoratis i Conispoliatis, 2003). Ovo demonstriraju brojni primeri insekatskih vrsta koje su, usled

ponovljenih ciklusa glacijacija i interglacijacija, promenile areal i/ili evoluirale širom evropskih i anadolijskih refugijuma (Hewitt, 1996, 2001; Balletto i Casale, 1991; Konstantinov i sar., 2009; Dapporto, 2010; Nicholls i sar., 2010; Zhu i sar., 2013). Tokom glacijacija, termofilni organizmi su se, u cilju preživljavanja, pomerali ka područjima nižih nadmorskih visina i geografskih širina, sa povoljnijim klimatskim uslovima. Ovakva područja nazivaju se mikrorefugijumi (Hewitt, 1996). Na području Evrope, bili su locirani južno od transverzalnih visokih planinskih lanaca, u vidu tri refugijalna područja Mediteranskih poluostrva (Iberijsko, Apeninsko i Balkansko poluostrvo) (Balletto i Casale, 1991; Hewitt, 1996, 1999; Taberlet i sar., 2008). Dolaskom interglacijacija, vrste bi selile svoja staništa na veće nadmorske visine. Kontrakcije areala tokom Pleistocena oblikovale su, u velikoj meri, diverzitet vrsta u refugijumima Mediteranskog basena, koji se danas smatra ključnim područjem („*hot spot*”) biodiverziteta čitave planete, sa visokim nivoom endemizama (Myers i sar., 2000). Pored Mediteranskog basena, značajnu ulogu refugijalnih područja za vreme glacijacija odigrali su Magreb i Mala Azija (Seddon i sar., 2002; Habel i sar., 2008). Može se pretpostaviti da su, poput mnogih drugih proučavanih taksona, vrste *M. avidus* kompleksa bile podložene kontrakcijama i ekspanzijama svog areala rasprostranjenosti tokom Pleistocena, unutar i van svojih refugijalnih područja. Distribucija vrsta *M. avidus* odgovara pomenutom „*grasshoper*” obrascu rekolonizacije prema Hewitt-u (1999), po kome su geografske barijere (poput planinskih masiva, moreuza i ostrvska izolovanost) zajedno sa širinom ekoloških niša, u velikoj meri oblikovale distribuciju analiziranih vrsta (Ačanski i sar., 2016a).

Mapa predviđene distribucije vrste *M. avidus* većim delom je u skladu sa do sada poznatim podacima o prisustvu jedinki ove vrste. Pored toga, severni deo Iberijskog poluostrva predviđen je kao relativno i veoma pogodno stanište navedene vrste, uprkos odsustvu poznatih podataka o njenoj prisutnosti na navedenom području (Slika 21a). U ovom trenutku, treba naglasiti da verovatnoća dobijena Maxent metodom predstavlja stepen pogodnosti pojedinih staništa za određenu vrstu, baziran isključivo na njegovoj klimatskoj pogodnosti. Ovim pristupom, pojedina područja prikazuju se kao potencijalno naseljena, čak i u slučajevima kada, usled uticaja različitih biotičkih i abiotičkih faktora, to u stvarnosti ne mogu biti. Pearson (2010) takođe ukazuje na moguću pojavu da modelovana distribucija ne odgovara blisko onoj stvarnoj, kao i da, u ovim slučajevima, prisustvo disperzivnih barijera (Peterson, 2002), kao i uticaj kompetitivnih vrsta (Anderson i sar., 2002), treba naknadno uzeti u obzir. Vrlo je verovatno da su klimatske podudarnosti

severnog Iberijskog polusotrova sa mediteranskom klimom tipičnom za vrstu *M. avidus* dovele do njegove karakterizacije kao pogodnog staništa za istu, što je u stvarnosti onemogućeno fizičkom barijerom u formi Pirinejskog planinskog lanca. Ovako okarakterisana potencijalna distribucija *M. avidusa* odrazila se, posledično, na test sličnosti niša u smeru *M. avidus*-*M. ibericus* -poređenjem projekcije *M. avidusa* sa ekološkim okvirom *M. ibericus*, nije potvrđeno da su njihove niše značajno manje slične, nego što bi se randomizacijom očekivalo (Tabela 17).

Analizom geografske distribucije vrsta moguće je steći bolji i sigurniji uvid u nepotpuno oformljenu sliku o njihovoj rasprostranjenosti. Iako se ranije smatralo sa je *M. moenium* vrsta sa arealom ograničenim samo na planinske delove Balkanskog poluostrva, naknadno je primećeno da, iako dominantno rasprostranjen u kontinentalnim delovima Evrope, ovaj takson naseljava i neke delove Mediteranskog basena i obale Crnog mora, gde može koegzistirati sa *M. avidus*-om. Rezultati modelovanja distribucije vrste *M. moenium* predvideli su pojedina područja Mediterana i obale Crnog mora kao visoko pogodna, čime su podržani noviji podaci o prisutnosti jedinki ove vrste i dobijena šira slika njihovog ekološkog okvira (Slika 21b).

Na osnovu klimatskih sličnosti Iberijskog polustrva i Maroka (gde su uzorkovane jedinke *M. ibericus*) sa područjima Male Azije, kao i grčkih ostrva Lezbos i Samos (gde je uzorkovan *M. megavidus*) sa okolnim ostrvima, pojedini regioni Male Azije ocenjeni su kao potencijalno povoljno stanište za *M. ibericus*, a sva egejska ostrva kao potencijalno stanište za *M. megavidus* (Slika 21c,d). Potencijalna distribucija *M. ibericus*-a na područjima Male Azije onemogućena je, u stvarnosti, fizičkim barijerama i udaljenošću od njegovog izvornog staništa. Takođe, dosadašnja terenska istraživanja drugih egejskih ostrva nisu zabeležila podatke o prisutnosti jedinki *M. megavidus*.

Modelovanje distribucije vrsta *M. avidus* kompleksa bazirano je na grupi od devet klimatskih varijabli, čiji je relativan i pojedinačni značaj u analizi procenjen u okviru jakknife procedure. Posmatranjem varijabli sa najvećim relativnim doprinosom u kreiranju modela distribucije, najveći relativni kvantitativni značaj imala je precipitacija (precipitacija u najhladnijem i najtoplijem kvartalu i precipitacija u najsuvljem mesecu i kvartalu u godini) (Tabela 16). Kvantifikacijom najvećeg pojedinačnog doprinosa varijabli uključenih u modelovanje, testiranjem modelovanja u prisustvu samo jedne varijable i ocenom uspešnosti projekcija, ponovo je, kod sve četiri vrste, najveću količinu informacije

nosila neka od varijabli povezana za precipitacijom (Slika 22; Slike 5a,b,c-Prilog). Stoga se sumarno pokazalo da najveći uticaj na areal rasprostranjenosti vrste *M. avidus* ima precipitacija u najhladnijem kvartalu, na areal rasprostranjenosti *M. ibericus* precipitacija u najtoplijem kvartalu, na areal rasprostranjenosti *M. moenium* precipitacija u najsuvljem kvartalu i precipitacija u najsuvljem mesecu, a na areal rasprostranjenosti *M. megavidus* sezonska precipitacija i precipitacija u najtoplijem kvartalu godine. Ekološke varijacije u precipitaciji spominjane su već, od strane drugih autora, kao potencijalno važan dokaz odigrane specijacije (Nosil i sar., 2009). U prethodnom istraživanju vrsta *M. avidus* i *M. moenium*, analiza glavnih komponenata (PCA), bazirana na klimatskom setu koji je uključivao i devet varijabli korišćenih u modelovanju distribucije kompleksa *M. avidus*, rezultovala je zaključkom da je vlaga odgovorna za 70% ekoloških varijacija između *M. avidusa* i *M. moeniuma* (Popović i sar., 2015). Primena ove analize na sve četiri vrste kompleksa, dovela je do gotovo istovetnog rezultata- najveći deo razlike u sredinskim faktorima između vrsta bio je vezan za količinu vlage i objasnio je 69% varijabilnosti (Ačanski, 2017). Samim tim, kvantitativna dominacija značaja precipitacije u modelovanju ekoloških niša svih vrsta analiziranog kompleksa predstavlja očekivan rezultat i ukazuje na dominantnu ulogu ovog faktora u formiranju areala distribucije vrsta, sa mogućim udelom u samom procesu njihove specijacije. Kvantitativni doprinos precipitacije u najsuvljem kvartalu i mesecu u definisanju areala vrste *M. moenium* delimično se poklapa sa rezultatima PCA analize (Popović i sar., 2015), kada su precipitacija u najtoplijem i precipitacija u najsuvljem kvartalu istaknute kao značajan ekološki faktor za distribuciju ove vrste. Navedeni ekološki činioci mogu se smatrati odgovornim za užu ekološku nišu *Merodon moenium* u odnosu na *Merodon avidus*, koji opstaje u širem opsegu temperature i vlažnosti i u nešto većem opsegu nadmorske visine. *M. moenium* preferira hladnija i vlažnija područja i aktivan je u kraćem intervalu tokom jedne godine. Dok su adultne jedinke *M. avidusa* aktivne od proleća do jeseni (u područjima mediteranske klime), jedinke *M. moeniuma* nisu pronađene nakon sredine avgusta.

Sa druge strane, procedurom izuzimanja pojedinačnih varijabli iz analize, do najvećeg pada uspešnosti modelovanja dovele su dve temperaturne varijable bio2 i bio18, što je ukazalo na to da su nosile najveći deo informacije koji nisu posedovale ostale varijable. Srednja vrednost temperaturnog gradijenta (bio2) nosila je, ukupno gledano, najdragoceniju informaciju za projekciju distribucije *M. avidus* kompleksa, pojavljujući se u ovoj ulozi kod tri od četiri analizirane vrste (*M. avidus*, *M. megavidus* i *M. ibericus*). Stoga je

primetno da je, uprkos jasnom dominiranju precipitacionih varijabli u kvantitativnom doprinosu modelovanju distribucije vrsta, temperaturni faktor nosio esencijalnu informaciju neophodnu za uspešnu procenu njihove rasprostranjenosti. Na ovaj način, opravdana je upotreba svih navedenih klimatskih varijabli u dobijanju uspešnog modela predikcije rasprostranjenosti vrsta proučavanog kompleksa.

Podaci o postojanju ekološke divergencije između različitih vrsta mogu pružiti značajnu potporu genetičkim podacima o prisustvu specijacije. Pretpostavke o značaju i ulozi ekologije u procesu specijacije jasno su demonstrirane i potvrđene kroz novija istraživanja iz ove oblasti (Stockman i sar., 2007; Zhou i sar., 2012; Nosil, 2012; Peterson i Hold, 2013; Zhu i sar., 2013). Areal distribucije vrste nalazi se pod uticajem njene ekološke niše (Peterson i Hold, 2013), koja je definisana kombinacijom ekoloških uslova i resursa, neophodnih za održavanje vijabilne populacije jednog organizma (MacArthur, 1984). Poznato je da su ekološki afiniteti blisko vezanih i kriptičnih vrsta jedinstveni (Penman i sar., 2005), kao i da postoji konzistentna i pozitivna asocijacija između ekološke divergencije i reproduktivne izolacije (Funk i sar., 2006). Stoga se dokaz o prisustvu različitih niša kod određenih taksona može posmatrati kao koristan kriterijum u njihovom razdvajanju.

Viša vrednost Šonerovog indeksa preklapanja niša kod para *M. avidus* i *M. ibericus* (0,245), u odnosu na druge parove *M. avidus* kompleksa, delimično je posledica navedene projekcije delova Iberijskog poluostrva kao potencijalno pogodnog staništa za obe vrste. Veće preklapanje niša uočeno je i između vrsta *M. avidus* i *M. moenium* (0,145), što odgovara poznatim podacima o distribuciji navedenih taksona, kao i genetički i morfološki baziranoj pretpostavci o sestrinskim vrstama sa skorijom specijacijom. Delimično preklapanje vrsta *M. avidus* i *M. moenium* u njihovom ekološkom okviru potiče od činjenice da ove dve vrste nisu geografski izolovane, već dele manji deo svog areala rasprostranjenosti. Na pojedinim kopnenim lokalitetima zabeležena su pojavljivanja *M. avidusa* i *M. moeniuma* na istom mikrostaništu, ali se, u tim slučajevima, jedinke dveju vrsta nisu pojavljivale istovremeno. Stoga je, na navedenim lokalitetima, sezona pojavljivanja jedinki bila od ključnog značaja za njihovu preliminarnu identifikaciju, naročito u slučajevima sličnih morfoloških karakteristika. U kontekstu temporalne divergencije dveju navedenih vrsta, bitno je istaći da Maxent, kao kompjuterski program, nema mogućnost uzimanja u obzir sezone kao faktora, prilikom vršenja predviđanja distribucije vrsta. Oslanjajući se na odabrane klimatske varijable i dosadašnje podatke o

geografskom prisustvu analiziranih jedinki, Maxent daje projekciju njihove potencijalne distribucije, koju je, potom, moguće porediti, po parovima vrsta. Samim tim, zanemarujući njihovu temporalnu divergenciju na simpatrijskim lokalitetima, Maxent, donekle, projektuje niše *M. avidusa* i *M. moeniuma* kao sličnije, nego što one, u realnom okviru, jesu. Navedeno opažanje ukazalo je na potrebu za proučavanjem značajnosti same sezone aktivnosti jedinki vrsta *M. avidus* i *M. moenium* u njihovoj diferencijaciji. Stoga je, u posljednjem segmentu ove disertacije, pristupljeno kreiranju modela predikcije za determinaciju jedinki *M. avidusa* i *M. moeniuma*, uz pomoć tehnika neuronskih mreža i regresionih stabala, upravo upotrebom vremenske varijable, u jednom od dva prikazana modela.

Izrazito male vrednosti svih koeficijenata preklapanja niša, kao i odbacivanje svih hipoteza o njihovoj identičnosti i sličnosti (sa izuzetkom hipoteze o sličnosti niša *M. avidus* i *M. ibericus*, u jednom smeru) (Tabela 17) pružaju potporu genetičkim podacima o genetičkoj diferencijaciji ovih vrsta *M. avidus* kompleksa. Ovakvi rezultati su u skladu sa jednom od hipoteza ove disertacije, da bi pojedini ekološki uslovi mogli doprineti postojanju sezonski uslovljenih fenotipova, kao i da bi mogli biti povezani sa samim genetičkim razdvajanjem u okviru *M. avidus* kompleksa. Stoga se može pretpostaviti da su klimatski faktori, koji su u ovom istraživanju pokazali najveći doprinos u definisanju ekoloških niša analiziranih vrsta, odigrali značajnu ulogu u njihovoj genetičkoj divergenciji i specijaciji.

Tačna identifikacija uzoraka na određenom području od velikog je značaja za formiranje efikasnih strategija uzorkovanja, kao i za uspostavljanje odgovarajućih programa zaštite biodiverziteta. Modelovanje determinacije jedinki savremenim pristupima veštačke inteligencije, algoritmima neuronske mreže i GBM metodom regresionih stabala, ilustrovalo je mogućnost primene ovih tehnika u svakodnevnim taksonomskim problemima pri radu sa kriptičnim vrstama. Determinacija morfološki neodvojivih taksona ostaje izazov pri radu sa navedenim vrstama koji je, u okviru kompleksa vrsta *M. avidus*, najizraženiji kod vrsta *M. avidus* i *M. moenium*. Uprkos različitim ekološkim profilima navedenih vrsta, delimično preklapanje njihovog prostornog areala može, u graničnom vremenskom trenutku njihovih, po pravilu različitih, sezona aktivnosti, dovesti do nesigurnosti u identifikaciji. Sa druge strane, genetička determinacija pojedinačnih uzoraka mora biti izvršena u laboratorijskim uslovima i, uprkos modernim i brzim pristupima DNK sekvenciranja, zahteva značajan vremenski utrošak. Pored toga, rezultati analiza

mitohondrijalnih DNK markera ukazali su na nedovoljnu upotrebljivost navedenih lokusa u razdvajanju sestrinskih vrsta *M. avidus* i *M. moenium*, te neophodnost primene biohemijskih markera u njihovoj delineaciji. Iako genetička potvrda diferencijacije svakako predstavlja najsigurniji dokaz taksonomske pripadnosti uzorkovanih jedinki, mogućnost sticanja brzog i preliminarnog uvida u taksonomsku strukturu uzorka mogla bi biti korisna za istraživačke grupe i planiranje logistike uzorkovanja. Modeli prikazani u ovoj disertaciji, istrenirani na poznatim podacima i kreirani za razdvajanje vrsta *M. avidus* i *M. moenium*, pokazali su se sposobnim da, na osnovu odabranih varijabli, sa visokom verovatnoćom odrede vrstu kojoj uzorak pripada. Prikazano modelovanje predstavlja pozitivan signal u pitanju potencijalne primene navedenih sistema u podršci inicijalne determinacije, kako na starim bazama podataka (sporno determinisane jedinke, označene u bazi kao *M. avidus/M. moenium*), tako i u determinaciji budućih novouzorkovanih jedinki. U drugom navedenom slučaju, veštačku inteligenciju ne treba shvatiti kao definitivan i potpuno pouzdan alat za automatsku determinaciju svih jedinki, već kao tehničku potporu samim taksonomima u spornim situacijama prve identifikacije uzoraka i pomoć pri donošenju odluke o označavanju pojedinih jedinki u bazi. Takođe, navedeni modeli mogli bi pronaći potencijalnu primenu u planiraju efikasnijih strategija terenskog uzorkovanja. U tom slučaju, ANN i/ili GBM predviđanja mogla bi biti korišćena u proceni verovatnoće pronalaženja određene vrste na konkretnom lokalitetu, definisanom njegovim koordinatama.

Upoređivanje rezultata dobijenih kroz različito pripremljene podatke ukazalo je, kod neuronskih mreža, na veći procenat tačne determinacije u slučaju korišćenja surogatnih podataka, odnosno, popunjavanja odustnih informacija predikcijom, u odnosu na modele trenirane na osnovu skraćene baze (formirane odstranjivanjem svih uzoraka za koje je neki podatak nedostajao). Tako je, upotrebom surogatnih podataka, prediktivna sposobnost neuronske mreže u Modelu 1 (predikcija geografskom varijablom), porasla sa 64,5% (rad sa skraćenom bazom) na 75,5%. Ista pojava, u neznatnijoj meri, uočena je kod Modela 2 neuronske mreže (predikcija vremenskom varijablom) - porast predikcije sa 86,8% (rad sa skraćenom bazom) na 87,8% (rad sa surogatnim podacima). Ovakav rezultat ohrabruje upotrebu surogatnih podataka, kreiranih od strane same neuronske mreže, u predikciji determinacije neidentifikovanih uzoraka. Nasuprot tome, predikcija GBM tehnikom dala je gotovo konstantan rezultat u sve tri varijante podataka (sirova baza, skraćena baza i baza popunjena surogatnim podacima), sa vrednostima koje su se kretale od 0,83 do 0,94

(Model 1) i oko 0,69 (Model 2). Imajući na umu da niža rezultujuća vrednost GBM tehnike ukazuje na veći procenat pogodaka u determinaciji vrste, uporednim sagledavanjem rezultata NN i GBM postaje izvesno da, u svim varijantama podataka, predikcija vremenskom varijablom pokazuje veću prediktivnu sposobnost pri determinaciji. Stoga se može zaključiti da su informacije o vremenu uzorkovanja jedinke bile od većeg značaja za uspostavljanje determinacijskog ključa jedinki algoritmima veštačke inteligencije, u odnosu na podatke o geografskoj širini i dužini mesta njihovog uzorkovanja. Ovi rezultati ukazuju na to da bi vreme aktivnosti adultnih jedinki moglo imati veći značaj u diferencijaciji vrsta *M. avidus* i *M. moenium*, nego tačan lokalitet njihove adultne aktivnosti. Odnosno, sezonski uslovljeni ekološki faktori i selekcionni pritisci mogli bi imati veću ulogu u samoj specijaciji vrsta *M. avidus* i *M. moenium*, u odnosu na one ekološke faktore i selekcionne pritiske, koji su uslovljeni geografskim položajem područja. Ovo je u skladu i sa rezultatima analize alozimske varijabilnosti ove disertacije, kojima je potvrđeno prisustvo temporalne divergencije *M. avidus* i *M. moeniuma* na istom lokalitetu, te je već ukazano na mogućnost da su razlike u sezonskim afinitetima pojedinih populacija mogle dovesti do postojećih genetičkih razlika između sestrinskih vrsta.

8. ZAKLJUČAK

Integrativno-taksonomski pristup analize kompleksa vrsta *Merodon avidus* (Diptera: Syrphidae), izvršen na godinama sakupljanom materijalu sa širokog geografskog područja, ispunio je sve predviđene ciljeve. U okviru genetičke karakterizacije kriptičnih vrsta navedenog kompleksa, bazirane na 3' i 5' fragmentima mitohondrijalnog COI gena, određeni su parametri genetičke varijabilnosti i utvrđeni jedinstveni i deljeni haplotipovi u okviru i između pretpostavljenih vrsta. Genetička polimorfnost kvantifikovana je i upotrebom alozimskih markera, koji su omogućili definitivno razgraničavanje dve sestrinske vrste. U nastavku, oslanjajući se na moderne tehnike veštačke inteligencije, izvršeno je modelovanje distribucije vrsta i poređenje sličnosti utvrđenih ekoloških niša. U poslednjem segmentu istraživanja, prednosti veštačke inteligencije iskorišćene su u modelovanju sistema za determinaciju jedinki sestrinskih vrsta u uzorku, na osnovu adekvatne varijable. Istraživanje obuhvaćeno ovom doktorskom disertacijom, dovelo je do sledećih zaključaka:

- kompleks vrsta *M. avidus* se, prema trenutnim informacijama, sastoji od 5 vrsta: *M. avidus*, *M. moenium*, *M. megavidus*, *M. ibericus* i *M. aff. moenium*;
- citohrom c-oksidadza I (COI) gen mtDNK predstavlja adekvatan barkod fragment za razdvajanje vrsta *M. megavidus*, *M. ibericus* i *M. aff. moenium* filogenetičkim metodama, ali ne poseduje dovoljnu rezoluciju za razdvajanje vrsta *M. moenium* i *M. avidus* u odvojene klasterne;
- rezultati genetičke varijabilnosti COI DNK sekvenci pokazali su da jedinke sa ostrva Krf i Evia i poluostrva Peloponez, preliminarno identifikovane kao *M. moenium*, predstavljaju novu, endemsku vrstu proučavanog kompleksa, označenu kao *M. aff. moenium*;
- genetičke analize su pokazale da jedinka 16536 sa ostrva Korzika pripada vrsti *M. moenium*, čime je dokazana mogućnost sinhronog i simpatričnog pojavljivanja *M. avidus* i *M. moenium* jedinki;
- isti genetički marker ukazao je na to da takson dokumentovan kao *M. hikmeti* ne predstavlja posebnu vrstu *M. avidus* kompleksa, te navedeni naziv, na osnovu zabeleženog holotipa, treba smatrati sinonimom za naziv *M. moenium*;

- enzimski lokusi AAT i IDH mogu se smatrati dijagnostičkim u razdvajanju vrsta *M. avidus* i *M. moenium*, koje, na osnovu vrednosti koeficijenta genetičke bliskosti, predstavljaju sestrinske vrste, koje su se, u okviru kompleksa vrsta *M. avidus*, poslednje razdvojile. Ovo objašnjava slabiju rezoluciju testiranog DNK markera u njihovoj delineaciji;

- rezultati analize alozimske varijabilnosti potvrdili su postojanje fenomena simpatrije vrsta *M. avidus* i *M. moenium* na jednom lokalitetu (Đerdap), uz prisustvo jasne temporalne divergencije navedenih populacija. Istim markerom potvrđena je pojava fenotipske plastičnosti u okviru vrste *M. avidus*, gde su dve generacije populacija sa istog lokaliteta (Umag), uprkos izvesnim morfološkim razlikama, genetički okarakterisane kao ista vrsta;

- modelovanje distribucije vrsta *M. avidus* kompleksa i statističko poređenje predviđenih niša, pokazalo je postojanje značajnih razlika u ekološkim profilima analiziranih vrsta. Time je pružena potpora morfološkim indicijama i genetičkim dokazima o njihovoj diferencijaciji i ukazano na to da su geološka istorija, geografsko-klimatske odlike staništa, kao i afiniteti jedinki prema određenim sezonama, doveli do specijacije danas prisutnih vrsta;

- ciljano kreiranje kompjuterskog modela sposobnog da ispravno identifikuje jedinku u uzorku kao *M. avidus* ili *M. moenium* potvrdilo je mogućnost upotrebe navedenih modela u pomoći pri inicijalnoj taksonomskoj determinaciji, ali i ukazalo na to da je podatak o vremenskom trenutku aktivnosti jedinki od većeg značaja za njihovu tačnu identifikaciju, od podatka o geografskim koordinatama njihovog lokaliteta.

Ovo istraživanje doprinelo je karakterizaciji biodiverziteta osolikih muva i rasvetljavanju taksonomskog statusa vrsta jedne od najzahtevnijih grupa familije Syrphidae. Objedinjavanjem postojećih informacija o kriptičnim taksonima i rezultata prezentovanih ovom disertacijom, omogućeno je ujednačavanje njihove nomenklature. Sinhronizovana upotreba predloženih naziva doprineće boljoj implementaciji ekološkog menadžmenta za svaki od imenovanih taksona. Podaci o genetičkoj diferencijaciji definisanih kriptičnih vrsta, kao i o njihovoj geografskoj distribuciji, predstavljaju smernice za definisanje budućih konzervacionih programa zaštite biodiverziteta vrsta *Merodon avidus* kompleksa.

9. LITERATURA

Ačanski J. (2017): Taksonomija i distribucija vrsta roda *Merodon* (Meigen, 1803) (Diptera: Syrphidae) u Palearktiku. Doktorska disertacija.

Ačanski J., Vujić A., Djan M., Obreht Vidaković D., Ståhls G., Radenković S. (2016a): Integrative taxonomy in defining species boundaries in *Merodon avidus* complex (Diptera, Syrphidae). *European Journal of Taxonomy*, 237: 1-25.

Ačanski J., Miličić M., Likov L., Milić D., Radenković S., Vujić A. (2016b): Environmental niche divergence of species from *Merodon ruficornis* group (Diptera: Syrphidae). *Archives of Biological Sciences*, 69(2): 247-259.

Adam-Bourdarios C., Cowan G., Germain-Renaud C., Guyon I., Kégl B., Rousseau, D. (2015): The Higgs Machine Learning Challenge. *Proceedings of the NIPS 2014 Workshop on High-energy Physics and Machine Learning*, PMLR 42:19-55.

Albiol J., Campmajo C., Casas C., Poch M. (1995): Biomass estimation in plant cell cultures: a neural network approach. *Biotechnology Progress*, 11: 88-92.

Anderson R.P., Peterson A.T., M. Gómez-Laverde M. (2002): Using niche-based GIS modeling to test geographic predictions of competitive exclusion and competitive release in South American pocket mice. *Oikos*, 98: 3-16.

Andrić A., Šikoparija B., Obreht D., Đan M., Preradović J., Radenković S., Pérez - Bañón C., Vujić A. (2014): DNA barcoding applied: identification of the larva of *Merodon avidus* (Diptera: Syrphidae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Praga*, 54(2): 741-757.

Araújo M. B., Williams P.H. (2000): Selecting areas for species persistence using occurrence data. *Biological Conservation*, 96: 331-345.

Austerlitz F., Olivier D., Schaeffer B., Bleakley K., Olteanu M., LeBlois R., Veuille M., Laredo C. (2009): DNA barcode analysis: a comparison of phylogenetic and statistical classification methods. *BMC Bioinformatics*, 10 (Suppl 14), S10, doi: 10.1186/1471-2105-10-S14-S10.

Avice J.C. (2000): *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Ayala F.J., Powell J., Tracey M., Mourao C., Perez-Salas S. 1972, Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics*, 70: 113-139.

Balletto E., Casale A. (1991): Mediterranean Insect conservation. In: Collins NM, Thomas JA, editors. *The conservation of insects and their habitats*. London: Academic Press, 121-42.

Berry P.M., Dawson T.P., Harrison P.A., Pearson R.G. (2002): Modelling potential impacts of climate change on the bioclimatic envelope of species in Britain and Ireland. *Global Ecology and Biogeography*, 11: 453-462.

Besansky N.J. (1999): Complexities in the analysis of cryptic taxa within the genus *Anopheles*. *Parassitologia*, 41: 97–100.

Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N.S., Ng P.K.L., Meier R., Winker K., Ingram K.K., Das I. (2007): Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 3(22): 148-153.

Bradley R.D, Durish N.D, Rogers D.S, Miller J.R, Engstrom M.D. (2007); Toward a molecular phylogeny for *Peromyscus*: evidence from mitochondrial cytochrome-b sequences. *Journal of Mammal*, 88: 1146-1159.

Breiman L., Friedman J.H., Olshen R.A., Stone C.J. (1984): *Classification and Regression Trees*. Wadsworth International Group, Belmont, CA, USA.

Breiman L. (2001): Statistical modeling: the two cultures. *Statistical Science*, 16: 199–215.

Brook B.W., Bradshaw C. J. A., Koh L. P., Sodhi N. S. (2006): Momentum drives the crash: mass extinction in the tropics. *Biotropica*, 38: 302-305.

Brower A.V. (1994): Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(14): 6491–6495.

Brown W.M, Prager E.M, Wang A., Wilson A.C (1982): Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18: 225-239.

Castoe, T. A., Jiang, Z.J., Gu, W., Wang, Z. O., Pollock, D. (2008): D. Adaptive evolution and functional redesign of core metabolic proteins in snakes. *PLoS One*. 3(5):e2201.

Chapman A.D (2009) Numbers of living species in Australia and the world, second edition. Australian Biological Resources Study.

Chapman T. (2006): Evolutionary conflicts of interest between males and females. *Current Biology*, 16: 744–754.

Chen H., Rangasam M., Tan S.Y., Wang H., Siegfried B.D. (2010): Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. – *PloS ONE* 5(8): e11963.

Colborn J., Crabtree R.E., Shaklee J.B., Pfeiler E., Bowen B.W. (2001): The evolutionary enigma of bonefishes (*Albula* spp.): cryptic species and ancient separations in a globally distributed shorefish. *Evolution*, 55: 807–820.

Da Fonseca R.R., Johnson W.E., O'Brien S. J., Ramos M. J., Antunes A. (2008): The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC Genomics* 9, 119.

Dapporto L. (2010): Speciation in Mediterranean refugia and postglacial expansion of *Zerynthia polyxena* (Lepidoptera, Papilionidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research.*, 48(3):229-37.

Desvignes J.F, Laroche J., Durrand J.D., Bouvet J. (2001): Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites. *Agriculture* 194 (3-4): 291-301.

De'ath G. (2002): Multivariate regression trees: a new technique for constrained classification analysis. *Ecology*, 83:1103–1117.

De'ath G. (2007): Boosted trees for ecological modeling and prediction. *Ecology*, 88(1): 243-251.

De'ath G., Fabricius K.E. (2000): Classification and regression trees: a powerful yet simple technique for the analysis of complex ecological data. *Ecology*, 81:3178–3192.

- Dimopoulos I., Chronopoulos J., Chronopoulou-Sereli A.(1999): Neural network models to study relationships between lead concentration in grasses and permanent urban descriptors in Athens city (Greece). *Ecological Modelling*, 120: 157-165
- Dobzhansky T.H. (1970): *Genetics of the Evolutionary Process*, Columbia University, New York.
- Elith J., Leathwick J.R., Hastie T. (2008): A working guide to boosted regression trees. *Journal of Animal Ecology*, 77: 802-813.
- Elith, J., Graham, C.H., Anderson, R.P. et al. (2006) Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography*, 29: 129–151.
- Environmental Systems Research Institute (ESRI) (2014): *ArcGIS Release 10.2*, Redlands, CA.
- Erwin T.L. (1997): *Biodiversity at Its Utmost: Tropical Forest Beetles*, in: Reaka-Kudla, M.L., Wilson D. E., Wilson, E.O. (Hg): *Biodiversity II, Understanding and protecting our biological resources*, Washington.
- Excoffier L., Lischer H.E.L. (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.
- Faraggi D., Simon R.(1995): A neural network model for survival data. *Statistics in Medicine*, 14: 73-82.
- Felsenstein J. (2005): *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6*. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Ferrier S., Watson G., Pearce J., Drielsma (2002): Extended statistical approaches to modelling spatial pattern in biodiversity in northeast new south wales. I. Species-level modelling. *Biodiversity and Conservation*, 11: 2275-2307.
- Feulner P.G.D., Kirschbaum F., Schugardt C., Ketmaier V., Tiedemann R. (2006): Electrophysiological and molecular genetic evidence for sympatrically occurring cryptic species in African weakly electric fishes (Teleostei: Mormyridae: *Campylomormyrus*). *Molecular Phylogenetical Evolution*, 39: 198–208.

- Fink J., Kukla G.J. (1977): Pleistocene Climates in Central Europe: At least 17 Interglacials after the Olduvai Event. *Quaternary Research*, 7: 363-371.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294–299.
- Francuski Lj., Ludoški J., Vujić A., Milankov V. (2009): Wing geometric morphometric inferences on species delimitation and intraspecific divergent units in the *Merodon ruficornis* group (Diptera: Syrphidae) from the Balkan Peninsula. *Zoological Science*, 26: 301-308.
- Francuski Lj., Ludoški J., Vujić A., 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: 379-388.
- Funk D.J., Nosil P., Etges W.J. (2006): Ecological divergence exhibits consistently positive associations with reproductive isolation across disparate taxa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 3209–3213.
- Galtier, N. (2009): Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: A reappraisal. *Molecular Ecology*, 18: 4541–4550.
- Gaston K.J., O'Neill M.A. (2004): Automated species identification: why not? . *Philosophical Transactions (B)*, 359: 655–667.
- Geller J.B. (1999): Decline of a native mussel masked by sibling species invasion. *Conservation Biology*, 13: 661–664.
- Gerhardt H.C. (2005): Acoustic spectral preferences in two cryptic species of grey treefrogs: implications for mate choice and sensory mechanisms. *Animal Behavior*, 70: 39–48.
- Goloboff P.A., Farris J.S., Nixon K.C. (2008): TNT, a free program for a phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24(5):774 – 786.
- Graham C.H., Ron S.R., Santos J.C., Schneider C.J., Moritz C. (2004): Integrating phylogenetics and environmental niche models to explore speciation mechanisms in Dendrobatid frogs. *Evolution*, 58: 1781-1793.

Grundt, H.H., Kjølner S., Borgen L., Rieseberg L.H., Brochmann C. (2006): High biological species diversity in the arctic flora. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 972–975

Guisan A., Broennimann O., Engler R., Vust M., Yoccoz N.G., Lehman A., Zimmermann N. E. (2006): Using niche based models to improve the sampling of rare species. *Conservation Biology*, 20: 501-511.

Habel J.C., Meyer M., El Mousadik A., Schmitt T. (2002): Africa goes Europe: The complete phylogeography of the marbled white butterfly species complex *Melanargia galathea/M. lachesis* (Lepidoptera: Satyridae). *Organisms, Diversity and Evolution*, 8(2):121-9.

Hampe, A. (2004): Bioclimatic models: what they detect and what they hide. *Global Ecology and Biogeography*, 11: 469-471.

Hannah L., Midgley G.F., Hughes G., Bomhard B. (2005) The view from the cape: extinction risk, protected areas, and climate change. *BioScience*, 55: 231-242.

Harris H., 1970 *The Principles of Human Biochemical Genetics*. Elsevier, New York.

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): 96-99. doi:10.1098/rsbl.2003.0025

Hebert P.D.N., Penton E. H., Burns J.M., Janzen D. H., Halwachs W. (2004): Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 14812–14817.

Heliconius erato inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(14): 6491–6495.

- Henry C.S. (1994): Singing and cryptic speciation in insects. *Trends of Ecology and Evolution*, 9: 388–392.
- Hewitt G.M. (1996): Some genetic consequences of ice ages, and their role, in divergence and speciation. *The Biological Journal of the Linnean Society*, 58(3):247-76.
- Hewitt G.M. (1999.): Post-glacial re-colonization of European biota. *The Biological Journal of the Linnean Society*, 68(1-2):87-112.
- Higgins S.I., Richardson D.M., Cowling R.M., Trinder-Smith T.H. (1999): Predicting the landscape-scale distribution of alien plants and their threat to plant diversity. *Conservation Biology*, 13: 303-313.
- Highton R. (2000): Detecting Cryptic Species Using Allozyme Data. In: Bruce R.C., Jaeger R.G., Houck L.D. (eds) *The Biology of Plethodontid Salamanders*. Springer, Boston, MA .
- Hijmans R., Graham C. (2006): The ability of climate envelope models to predict the effect of climate change on species distributions. *Global Change Biology*, 12: 2272 – 2281.
- Hijmans R.J., Cameron S.E., Parra J.L., Jones P.G., Jarvis A. (2005): *The WorldClim Interpolated Global Terrestrial Climate Surfaces*. Berkeley, CA, USA: University of Berkeley. <http://www.worldclim.org/current>.
- Hirzel A.H., Hausser J., Chessel D., Perrin N. (2002): Ecological-niche factor analysis: How to compute habitat-suitability map without absence data. *Ecology*, 83: 2027-2036.
- Hunter R., Markert C. (1957): Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 125: 1294-1295.
- Hurkmans W., Hayat R. (1997): Ethology and ecology of *Merodon* (Diptera, Syrphidae) in Turkey II: descriptions of new species and notes on other syrphid flies. *Dipterists Digest*, 3: 62-79.
- Hurkmans W. (1985): Territorial behaviour of two *Merodon* species (Diptera: Syrphidae). *Ent. Ber.*, 45: 69-70.
- Hurkmans W. (1988): Ethology and ecology of *Merodon* in Turkey (Diptera: Syrphidae). *Ent. Ber. Amst.*, 48: 107-114.

- Hurkmans W. (1993): A monograph of *Merodon* (Diptera: Syrphidae). Part 1, Tijdschrift Voor Entomologie, 136: 147-234.
- Hutchinson G.E. (1957): Concluding remarks. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 22: 415-427.
- Iverson L.R., Prasad A.M. (1998): Predicting abundance of 80 tree species following climate change in the eastern United States. Ecological Monographs, 68: 465-485.
- James J.E., Piganeau G., Eyre-Walker A. (2015): The rate of adaptive evolution in animal mitochondria. Molecular Ecology, 25: 67–78.
- Jensen J.L., Bohonak A.J., Kelley S.T. (2005): Isolation by distance, web service. BMC Genetics 6: 13.
- Johnson F.M., Kanapi C.G., Richardson R.H., Wheeler M.R., Stone W.S. (1966): An analysis of polymorphisms among isozyme loci in dark and light *Drosophila ananassae* strains from American and Western Samoa. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 56: 119-125.
- Joy M.K., Death R.G. (2004): Predictive modelling and spatial mapping of freshwater fish and decapod assemblages using GIS and neural networks. Freshwater Biology, 49: 1036-1052.
- Kaloveloni A., Tscheulin T., Vujic A., Radenković S., Petanidou T. (2011): Winners and losers of climate change for the genus *Merodon* (Diptera: Syrphidae) across the Balkan Peninsula. Ecological Modelling 313: 201-211.
- Kimura M., Crow J.F. (1964): The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics, 49: 725-738.
- Knouft J.H., Losos J. B., Glor R. E., Kolbe J. J. (2006): Phylogenetic analysis of the evolution of the niche in lizards of the *Anolis sagrei* group. Ecology, 87(Suppl.):29–38.
- Knowlton N. (1986): Cryptic and sibling species among the decapod Crustacea. J. Crustacean Biology; 6: 356–363.

- Kocis Tubic N., Ačanski J., Stahls G., Djan M. (2018): An integrative approach in the assessment of species delimitation and structure of the *Merodon nanus* species group (Diptera: Syrphidae). *Organisms Diversity and Evolution*, 18(4): 479-497.
- Konstantinov A.S., Korotyaev B.A., Volkovitsh M.G. (2009): Insect biodiversity in the Palearctic Region. In: Foottit R.G., Adler P.H. (eds) *Insect biodiversity: science and society*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. p.107-162.
- Kozak J.H. , Wiens J.J. (2006): Does niche conservatism promote speciation? A case study in North American salamanders. *Evolution*, 60: 2604-2621.
- Kumar S., Stohlgren T.J. (2009): Maxent modeling for predicting suitable habitat for threatened and endangered tree *Canacomyrica monticola* in New Caledonia. *Journal of Ecology and Natural Environment*,1(4): 094-098.
- Lawton J.L. (2000): Concluding remarks: a review of some open questions. Pages 401-424 in M. J. Hutchings, E. John, and A. J. A. Stewart, editors. *Ecological Consequences of Heterogeneity*. Cambridge University Press.
- Leathwick J.R., Elith J., Francis M.P., Hastie T., Taylor, P. (2006): Variation in demersal fish species richness in the oceans surrounding New Zealand: an analysis using boosted regression trees. *Marine Ecology Progress Series*, 321: 267–281,
- Leathwick J.R., Elith, J., Chadderton W.L., Rowe D., Hastie T. (2008): Dispersal, disturbance, and the contrasting biogeographies of New Zealand's diadromous and non-diadromous fish species. *Journal of Biogeography*, 34: 1481-1497.
- Leathwick J.R., Rowe D., Richardson J., Elith J., Hastie T. (2005): Using multivariate adaptive regression splines to predict the distribution of New Zealand's freshwater diadromous fish. *Freshwater Biology*, 50: 2034-2052.
- Lefébure T., Douady C.J., Gouy M., Trontelj P., Briolay J., Gibert J. (2006): Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments. *Molecular Ecology*, 15: 1797–1806.
- Lek S., Delacoste M., Baran P. (1996): Application of neural networks to modelling nonlinear relationships in ecology. *Ecological Modelling*, 90: 39-52.

- Lek S., Goégan JF. (1999): Artificial neural networks as a tool in ecological modelling, an introduction. *Ecological modeling*, 120 (2-3): 65-73.
- Lerner B., Levinstein M., Rosenberg B., Guterman H., Dinstein I., Romem Y. (1994): Feature selection and chromosomes classification using a multilayer perceptron neural network., *IEEE Int. Conference on Neural Networks*, Orlando (Florida): 3540 – 3545.
- Lewontin R.C., Hubby L. (1966): A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. Amounts of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54: 595-609.
- Lo J.Y., Baker J.A., Kornguth P.J., Floyd C.E. (1995): Application of Artificial Neural Networks to Interpretation of Mammograms on the Basis of the Radiologists Impression and Optimized Image Features. *Radiology*, 197: 242 – 242
- Losos J. B., Leal M., Glor R. E., DeQueiroz K., Hertz P. E. (2003): Niche lability in the evolution of a Caribbean lizard community. *Nature*, 424: 542–550.
- MacArthur R.H. (1984): *Geographical ecology: patterns in the distribution of species*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 269 p.
- Mantel N. 1967: The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Canc. Res.* 27: 209–220.
- Marcos-García M.A., Vujić A., Mengual X. (2007): Revision of Iberian species of the genus *Merodon* Meigen, 1803 (Diptera: Syrphidae). *European Journal of Entomology*, 104: 531- 572.
- Marcos-García MA, Vujić A, Ricarte A, Ståhls G. (2011): Towards an integrated taxonomy of the *Merodon equestris* species complex (Diptera: Syrphidae) including description of a new species, with additional data on Iberian *Merodon*. *Canadian Entomologist*, 143: 32-348.
- Martinson D.G., Pisias N.G., Hays J.D., Imbrie J., Moore T.C., Shackleton N.J. (1987): Age dating and the orbital theory of the ice ages: development of a high resolution 0-300,000 year chronostratigraphy. *Quaternary Research*, 27: 1-29.

- Masnadi-Shirazi H., Vasconcelos N. (2014): On the Design of Loss Functions for Classification: theory, robustness to outliers and SavageBoost (Lecture). Statistical Visual Computing Laboratory, University of California, San Diego.
- Mayden R.L. (1997): A hierarchy of species concept: the document in the saga of the species problem. In: Species: The units of biodiversity: 381-424.
- Mayr E. (1963): Animal Species and Evolution. Harvard University Press.
- McCulloch W., Pitts W. (1943): "A Logical Calculus of Ideas Immanent in Nervous Activity". Bulletin of Mathematical Biophysics, 5(4): 115–133.
- Mengual X., Ståhls G, Tojo S. (2008): 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: 543–562.
- Mengual X., Ståhls G., Vujić A., Marcos-García M. (2006): Integrative taxonomy of Iberian *Merodon* species (Diptera, Syrphidae). Zootaxa, 1377: 1-26.
- Milankov V. (2000): Evolucionni odnosi vrsta ruficornis i aeneus grupa roda *Merodon* Meigen, 1803 (Diptera: Syrphidae). Doktorska disertacija.
- Milankov V., Ludoški J. , Vujić A. (2004): Genetic differentiation between conspecific populations of *Merodon avidus* A (Diptera:Syrphidae). Proceeding of Nature Science Matica Srpska (Novi Sad), 107: 33– 44.
- Milankov V., Ludoški J., Ståhls G., Stamenković J., 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, 155: 819-833.
- Milankov V., Vujić A., Ludoški, J. (2001): Genetic divergence among cryptic taxa of *Merodon avidus* (Rossi, 1790) (Diptera: Syrphidae). International Journal of Dipterological Research, 2: 15-24.
- Milankov V, Ståhls G, Vujić A. (2008): Molecular diversity of populations of the *Merodon ruficornis* group on the Balkan Peninsula. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 46: 143-152.

- Milanovich J.R., Peterman W.E., Nibbelink N.P., Maerz J.C. (2010): Projected Loss of a Salamander Diversity Hotspot as a Consequence of Projected Global Climate Change. PLoS ONE, 5(8): e12189.
- Milić D., Radenković S., Stepanov J., Miličić M., Vujić A. (2013): Prediction of current distribution of *Cheilosia proxima* group (Diptera: Syrphidae) of Balkan Peninsula. Matica Srpska Journal for Natural Sciences, 125: 69-78.
- Milić D., Radenković S., Ačanski J., Vujić A. (2019): The importance of hidden diversity for insect conservation: a case study in hoverflies (the *Merodon atratus* complex, Syrphidae, Diptera). Journal of Insect Conservation, 23:29–44
- Murienne J (2009). New Caledonia: biology. In Gillespie R. and Clagues D. (eds.). Pages 643-645; Encyclopedia of Islands; University of California Press, Berkeley.
- Mustapha IB., Saeed F. (2016): Bioactive molecule prediction using extreme gradient boosting. Molecules, 21(8). DOI: 10,3390/molecules21080983
- Mutanen M, Pretorius E. (2007): Subjective visual evaluation vs. traditional and geometric morphometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia. Systematic Entomology, 32: 371-386.
- Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., Fonseca G.A.B., Kent J. (2000): Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, 403: 853–858.
- Nei M. (1978): Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583-590,
- Nicholls J.A., Preuss S., Hayward A., Melika G., Csoka G.Y., Nieves-Aldrey J., Askew R.R., Tavakoli M., Schonrogge K., Stone G.N. (2010): Concordant phylogeography and cryptic speciation in two Western Palearctic oak gall parasitoid species complexes. Molecular Ecology, 19(3):592-609.
- Nixon K.C. (2002): Winclada, v. 1,00,08. Program i dokumentacija dostupni na www.cladistics.com.
- Nosil P. (2012): Ecological speciation. Oxford: Oxford University Press, 280 p.

- Nosil P., Harmon L.J., Seehausen O. (2009): Ecological explanations for (incomplete) speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, 24:145–156.
- Patwardhan A., Ray S., Roy A. (2014): Molecular Markers in Phylogenetic Studies – A Review. *J Phylogen Evolution Biol* 2: 131. doi:[10,4172/2329-9002,1000131](https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000131)
- Pearson R.G. (2010): Species' Distribution Modeling for Conservation Educators and Practitioners. *Lessons in Conservation*, 3:54-89.
- Peck L.V. (1988): Syrphidae. In A. Soos and L. Papp (Eds) *Catalogue of Palaearctic Diptera* Budapest: Akadémiai Kiadó : 11-230.
- Penman T.D., Mahony M.J., Towerton A.L., Lemckert F.L.(2005): Bioclimatic analysis of disjunct populations of the giant burrowing frog *Heleioporus australiacus*. *Journal of Biogeography*, 32: 397–405.
- Pentinsaari M., Salmela H., Mutanen M., Roslin T. (2016): Molecular evolution of a widely-adopted taxonomic marker (COI) across the animal tree of life. *Sci. Rep.* 6, 35275; doi: [10,1038/srep35275](https://doi.org/10.1038/srep35275)
- Perissoratis C., Conispolatis N. (2003): The impacts of sea- level changes during latest Pleistocene and Holocene times on the morphology of the Ionian and Aegean seas (SE Alpine Europe). *Marine Geology*, 196: 145-156.
- Pesole, G., Gissi, C., De Chirico, A., Saccone, C. (1999): Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 48: 427–434.
- Petanidou T., Vujić A., Ellis W.N. (2011): Hoverfly diversity (Diptera: Syrphidae) in a Mediterranean scrub community near Athens, Greece. *Annales de la Société Entomologique de France*, 47: 168-175.
- Peterson A.T., Holt RD. (2003): Niche differentiation in Mexican birds: using point occurrences to detect ecological innovation. *Ecology Letters*, 6:774–782.
- Peterson A.T., Ortega-Huerta M.A., Bartley J., Sanchez- Cordero V., Soberon J., Buddemeier R.W., Stockwell D.R.B. (2002): Future projections for mexican faunas under global climate change scenarios. *Nature*, 416: 626-629.

- Phillips S.J., Dudik M.(2008): Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography*, 31(2):161-75.
- Phillips S.J., Anderson R.P., Schapire R.E. (2006): Maximum entropy modelling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190:231–259.
- Phoboo AE. (2014.): Machine Learning wins the Higgs Challenge. CERN Bull. 2014. <http://cds.cern.ch/journal/CERNBulletin/2014/49/News%20Articles/1972036>
- Popov G. V. (2010): *Merodon alexandri* spec. nov. - a new species of hoverfly (Diptera: Syrphidae) from the northern Black Sea Region. *Studia dipterologica*, 16: 133-151.
- Popović D., Ačanski J., Đan M., Obreht D., Vujić A., Radenković S. (2015): Sibling species delimitation and nomenclature of the *Merodon avidus* complex (Diptera: Syrphidae). *European Journal of Entomology*, 112(4): 790-809.
- Popović D., Đan M., Šašić L., Šnjegota D., Obreht D., Vujić A. (2014): Usage of different molecular markers in delimitation of cryptic taxa in *Merodon avidus* species complex (Diptera: Syrphidae). *Acta Zoologica Bulgarica*, 7: 33-38.
- Popović V., Popović D. (2017): Neural Network Based Approach of Software Maintenance Prediction for Laboratory Information System. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Computer and Systems Engineering*, 11(9): 1041-1045.
- Porter T.M. (2018): Over 2,5 million COI sequences in GenBank and growing. *PLoS One*, 13(9): e0200177. doi: 10.1371/journal.pone.0200177
- Preradović J., Andrić A., Radenković S., Zorić L., Pérez-Bañón C., Campoy A., Vujić A. (2018): Pupal stages of three species of the phytophagous genus *Merodon* Meigen (Diptera: Syrphidae). *Zootaxa*, 4420(2): 229-242.
- García-Roselló E., Guisande, C., Gonzalez-Dacosta J., Heine J., Pelayo-Villamil P.P., Manjares-Hernande A., Vaamonde, A., Granado-Lorencio C. (2013): ModestR: a software tool for managing and analyzing species distribution map databases. *Ecography*, 36: 1202–1207.

Prakash S., Lewontin R., Hubby J. (1969): A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 61: 841-858.

Proctor M, Yeo P, Lack A (1996): *The Natural History of Pollination*, The New Naturalist Series, Harper & Collins Publishers, New York.

Radenković S., Vujić A., Ståhls G., Pérez-Bañón C, Rojo S, Petanidou T., Šimić S. (2011): Three new cryptic species of the genus *Merodon* Meigen (Diptera: Syrphidae) from the island of Lesbos (Greece). *Zootaxa*, 2735: 35-56.

Radenković S., Šašić Zoric L., Djan M., Obreht Vidaković D., Ačanski J., Ståhls G., Veličković N., Markov Z., Petanidou T., Kočiš Tubić N., Vujić A. (2018a): Cryptic speciation in the *Merodon luteomaculatus* complex (Diptera: Syrphidae) from the eastern Mediterranean. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 56(2): 170-191. doi: 10.1111/jzs.12193

Radenković Lj., Veličković N., Ssymank A., Obreht Vidaković D., Djan M., Ståhls G., Veselić S., Vujić A. (2018b): Close relatives of the Mediterranean endemo-relict hoverflies (Diptera: Syrphidae) in South Africa: morphological and molecular evidence in the *Merodon melanocerus* subgroup. *PLoS One*, 13(7):e0200805. doi: 10.1371/journal.pone.0200805

Raxworthy C.J., Ingram C., Rabibosa N., Pearson R.G. (2007): Species delimitation applications for ecological niche modeling: a review and empirical evaluation using *Phelsuma* day gecko groups from Madagascar. *Systematic Biology*, 56(6): 907–923.

Raxworthy C.J., Martinez-Meyer E., Horning N., Nussbaum R.A., Schneider G.E., Ortega-Huerta M.A., Peterson A.T. (2003): Predicting distributions of known and unknown reptile species in Madagascar. *Nature*, 426: 837-841.

Ricarte A., Nedeljković Z., Rotheray G.E., Lyszkowski R.M., Hancock E.G., Watt K. (2012): Syrphidae (Diptera) from the Greek island of Lesbos, with description of two new species. *Zootaxa*, 3175: 1-23.

Ricarte A., Souba-Dols G.J., Hauser M., Marcos-García M.A. (2017): A review of the early stages and host plants of the genera *Eumerus* and *Merodon* (Diptera: Syrphidae), with new data on four species. *PLoS ONE*, 12 (12):1–22.

- Rocha L.A., Rocha C.R., Robertson D.R., Bowen B.W. (2008): Comparative phylogeography of Atlantic reef fishes indicates both origin and accumulation of diversity in the Caribbean. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 157.
- Rocha-Olivares A., Fleeger J.W., Foltz D.W. (2001): Decoupling of molecular and morphological evolution in deep lineages of a meiobenthic harpacticoid copepod. *Molecular Biology Evolution*, 18: 1088–1102.
- Ronquist, F., Teslenko M., Mark P., Ayres DL., Darling, A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P. (2012): MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3): 539-542.
- Rosasco L., De Vito E.D., Caponnetto, A., Piana, M., Verri, A. (2004). : Are Loss Functions All the Same?. *Neural Computation*, 16(5): 1063–1076.
- Rotheray G.E., Gilbert F. (2011): *The Natural History of Hoverflies*. Forrest Text, Ceredigion.
- Royas R. (1996): *Neural Networks - A Systematic Introduction*. Springer-Verlag, Berlin, New-York, 502 pp.
- Russo C.A., Takezaki N., Nei M. (1996): Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 525-536.
- Saez A.G., Lozano E. (2005): Body doubles. *Nature*, 433: 111.
- Schapire R. (2003): The boosting approach to machine learning – an overview. MSRI Workshop on Nonlinear Estimation and Classification, 2002 (eds D.D. Denison, M. H. Hansen, C. Holmes, B. Mallick & B. Yu). Springer, New York.
- Schoener T.W. (1968): The Anolis lizards of Bimini: resource partitioning in a complex fauna. *Ecology*. 1968; 49(4):704-26.
- Schönrogge K., Barr B., Wardlaw J., Napper E., Gardner M. G., Breen J., Elmes G.W., Thomas J.A. (2002): When rare species become endangered: cryptic speciation in myrmecophilous hoverflies. *Biological Journal of Linnean Society*, 75: 291–300,

Seddon J.M., Santucci F., Reeve N., Hewitt G.M. (2002):Caucasus Mountains divide postulated postglacial colonization routes in the white-breasted hedgehog, *Erinaceus concolor*. *Journal of Evolution and Biology*, 15(3):463-7.

Selander K., Yang S.J. (1969): Protein polymorphism and genic heterozygosity in a wild population of the house mouse (*Mus musculus*). *Genetics*, 63: 653-667.

Shikano T., Shimada Y., Herczeg G., Merilä J. (2010): History vs. habitat type: explaining the genetic structure of European nine-spined stickleback (*Pungitius pungitius*) populations. *Molecular Ecology*, 19 (6): 1147–1161.

Shmueli G., Patel N.R., Bruce P.C. (2010): *Data Mining for Business Intelligence: Concepts, Techniques, and Applications in Microsoft Office Excel with XLMiner*. John Wiley and Sons, New Jersey.Print. 428 pp.

Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., H., Liu Flook P. (1994): Evolution, weighing, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of con-served polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651-701.

Soberon J., Sanchez-Cordero V.(1999): Conservatism of Ecological Niches in Evolutionary Time. *Science*, 285: 1265-1267.

Speight M.C.D. (2015): Species accounts of European Syrphidae (Diptera). *Syrph the Net, the database of European Syrphidae*, vol. 83, Syrph the Net publications, Dublin.

Speight M.C.D. (2017): Species accounts of European Syrphidae (Diptera). *Syrph the Net, the database of European Syrphidae*, vol. 97, 294 pp.

Ståhls G., Vujčić A., Perez-Banon C., Radenković S., Rojo S., Petanidou T. (2009). COI barcodes for identification of *Merodon* hoverflies (Diptera, Syrphidae) of Lesvos Island, Greece. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1431-1438.

Ståhls G., Vujčić A., Petanidou T., Cardoso P., Radenković S., Ačanski J. (2016): Phylogeographic patterns of *Merodon* hoverflies in the Eastern Mediterranean region: revealing connections and barriers. *Ecology and Evolution*, 6(7): 2226-2245.

StatSoft Inc. 2011: STATISTICA (data analysis software system), Ver. 10: Available from: www.statsoft.com.

- Stebbins G.L. (1950): Variation and Evolution in Plants. Columbia University Press.
- Stockman A.K., Bond J.E. (2007): Delimiting cohesion species: extreme population structuring and the role of ecological interchangeability. *Molecular Ecology*, 16(16):3374-92.
- Stuart B.L., Inger R.F., Voris H.K. (2006): High level of cryptic species diversity revealed by sympatric lineages of Southeast Asian forest frogs. *Biological Letter*; 2: 470–474.
- Swets, J.A. (1988): Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*, 240: 1285-1293.
- Šašić Lj., Ačanski J., Vujić, Stahls G., Radenković S., Milić D, Obreht Vidaković D., Đan M. (2016): Molecular and morphological inference of three cryptic species within the *Merodon aureus* species group (Diptera: Syrphidae). *PlosOne*: 11(8):e0160001. doi: 10.1371/journal.pone.0160001.
- Šašić Zorić Lj., Ačanski J., Đan M., Kočiš Tubić N., Veličković N., Radenković N., Vujić A. (2018): Integrative taxonomy of *Merodon caerulescens* complex (Diptera: Syrphidae)-evidence of cryptic speciation. *Zbornik matice srpske za prirodne nauke* 135: 103-118.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A., Cosson J.(1998): Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*:7(4):453-64.
- Tadeusiewicz R., Chaki R., Chaki N. (2014): Exploring Neural Networks with C#. CRC Press, 298 pp.
- Tautz D., Arctander P., Minelli A., Thomas RH., Vogler AP. (2003): A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 70–74.
- Thompson F.C., Rotheray G.E. (1998): Family Syrphidae. In: Papp L., Darvas B. (eds.) *Contributions to a manual of Palaearctic Diptera: with special reference to flies of economic importance*. Budapest: Science Herald: 81-139.
- Thompson, F.C. (1999): A key to the genera of the flower flies (Diptera: Syrphidae) of the Neotropical Region including descriptions of new genera and species and a glossary of taxonomic terms used. *Contributions Entomology International*, 3: 321-378.

- Thuiller W., Richardson D.M., Pysek P., Midgley G.F., Hughes G.O., Rouget M.(2005): Niche-based modeling as a tool for predicting the global risk of alien plant invasions. *Global Change Biology*, 11: 2234-2250.
- Van Veen M. (2004): *Hoverflies of Northwest Europe*. KNNV Publishing, Utrecht, Netherlands.
- Vázquez-Prieto S., Vilas R., Mezo M., González-Warleta M., Ubeira F.M., Paniagua E. (2011): Allozyme markers suitable for population genetic analysis of *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 176(1): 84-88.
- Vayssières M.P., Plant R.E., Allen-Diaz B.H. (2000): Classification trees: an alternative non-parametric approach for predicting species distributions. *Journal of Vegetation Science*, 11:679–694.
- Veselic S., Vujić A., Radenković S. (2017): Three new Eastern-Mediterranean endemic species of the *Merodon aureus* group (Diptera: Syrphidae). *Zootaxa*, 4254(4): 401-434.
- Vrijenhoek R.C., Schutz S.J., Gustafson R.G., Lutz R.A. (1994): Cryptic species of deep sea clams (Mollusca, Bivalvia, Vesicomidae) from hydrothermal vent and cold water seep environments. *Deep-Sea Research Part I*, 41: 1171–1189.
- Vujić A., Radenković S., Likov L., Andrić A., Gilasian E., Barkalov A. (2019): Two new enigmatic species of the genus *Merodon* Meigen (Diptera: Syrphidae) from the north-eastern Middle East. *Zootaxa*, 4555(2):187-208.
- Vujić A., Ståhls G., Ačanski J., Rojo S., Pérez-Bañón C., Radenković S.(2018a): Review of the *Merodon albifasciatus* Macquart species complex (Diptera: Syrphidae): the nomenclatural type located and its provenance discussed. *Zootaxa*, 4374(1): 25-48.
- Vujić A., Radenković S, Likov L. (2018b): Revision of the Palearctic species of the *Merodon desuturinus* group (Diptera, Syrphidae). *Zookeys*, 771: 105-138.
- Vujić A., Marcos-García M.A., Sarıbıyık S., Ricarte A. (2011): New data for the *Merodon* Meigen 1803 fauna (Diptera: Syrphidae) of Turkey including a new species description and status changes in several taxa. *Annales de la Societe Entomologique de France*, 47: 78-88.

- Vujić A., Perez-Banon C., Radenković S., Ståhls G., Rojo S., Petanidou T., Šimić S. (2007): Two new species of genus *Merodon* Meigen, 1803 (Syrphidae, Diptera) from the island of Lesbos (Greece), in the eastern Mediterranean. *Annales de la Societe Entomologique de France*, 43: 319-326.
- Vujić A., Petanidou T., Tscheulin T., Cardoso P., Radenković S., Ståhls G., Baturan T., Mijatović G., Rojo S., Pérez-Bañón C., 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,
- Vujić A., Radenković S., Ačanski J., Grković A., Taylor M., Şenol S.G., 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., Ståhls G., Ačanski J., Bartsch H., Bygebjerg R., Stefanović A. (2013a): Systematics of Pipizini and taxonomy of European Pipiza Fallen: molecular and morphological evidence (Diptera: Syrphidae), *Zoologica Scripta*, 3: 288-305.
- Vujić A., Radenković S., Likov L., Trifunov S., Nikolić T. (2013b): Three new species of the *Merodon nigritarsis* group (Diptera: Syrphidae) from the Middle East. *Zootaxa*, 3640: 442-464.
- Vujić A., Radenković S., Ståhls G., Ačanski J., Stefanović A., Veselić S., Andrić A., Hayat R. (2012): Systematics and taxonomy of the ruficornis group of genus *Merodon* Meigen (Diptera: Syrphidae). *Systematic Entomology*, 37: 578-602.
- Wan Q.H., Wu, H., Fujihara, T., Fang S.G. (2004): Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis*, 25: 2165–2176.
- Warren D.L., Glor R.E., Turelli M. (2010): ENMTools: a toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography*, 33(3):607-11.
- Watts M.J., Worner S.P. (2012): Using artificial neural networks to predict the distribution of bacterial crop diseases from biotic and abiotic factors. *Computational Ecology and Software*, 2(1):70-79.
- Webos P. (1974): Beyond regression: new tools for prediction and analysis in the behavioral sciences. Thesis, Harvard University.

Weir B.S., Cockerham C.C. (1984): Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.

Wilson E.O. (2006): Threats to Global Diversity: <http://www.globalchange.umich.edu/globalchange2/current/lectures/biodiversity/biodiversity.html>.

Wiens J.J., Graham C.H. (2005): Niche conservatism: Integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 36:519–539.

Worner S.P., Gevrey M. (2006): Modelling global insect pest species assemblages to determine risk of invasion. *Journal of Applied Ecology*, 43: 858-867.

Yeh F.C., Yang R., Boyle T.(1999): POPGENE v. 1,31, Microsoft Windows Based Freeware for Population Genetic Analysis. Renewable Resources, Faculty of Agricultural, Environmental and Life Sciences, University of Alberta. Available from: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>.

Zhang W.J. (2010): *Computational Ecology: Artificial Neural Networks and Their Applications*. World Scientific, Singapore.

Zhang W.J. (2011): Simulation of arthropod abundance from plant composition. *Computational Ecology and Software*, 1(1):37-48.

Zhang W.J. (2007): Computer inference of network of ecological interactions from sampling data. *Environmental Monitoring and Assessment*, 124: 253-26.

Zhang W.J., Barrion V.T. (2006): Function Approximation and Documentation of Sampling Data Using Artificial Neural Networks. *Environmental Monitoring and Assessment*, 122 (1-3): 185-201.

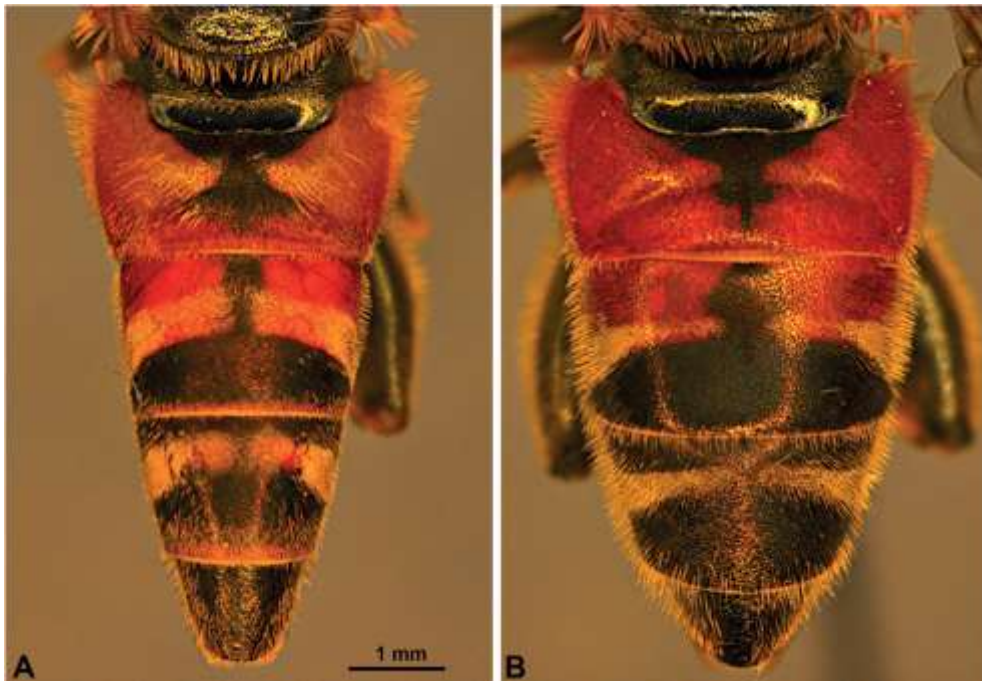
Zhang W.J., Wei W. (2009): Spatial succession modeling of biological communities: a multi-model approach. *Environmental Monitoring and Assessment*, 158: 213-230.

Zhou W.W., Wen Y., Fu J, Xu YB., Jin J.Q., Ding L., Min M.S., Che J., Zhang Y.P. (2012): Speciation in the *Rana chensinensis* species complex and its relationship to the uplift of the Qinghai- Tibetan Plateau. *Molecular Ecology*, 21(4):960-73.

Zhu G., Liu G., Bu W., Lis J.A. (2013): Geographic distribution and niche divergence of two stinkbugs, *Parastrachia japonensis* and *Parastrachia nagaensis*. *Journal of Insect Science*, 13(1):102.

Zuckerkindl E., Pauling L. (1965): Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson V, Vogel HJ. *Evolving genes and proteins*. Academic Press, New York. pp. 97-166.

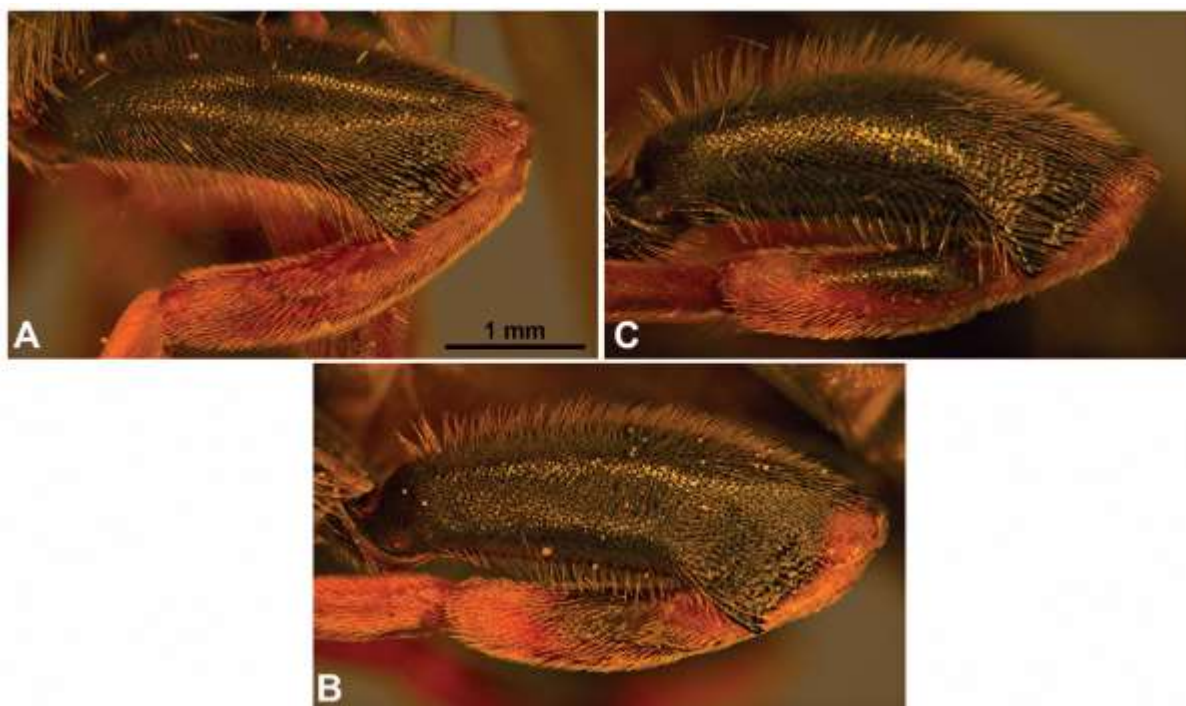
10. PRILOG



Slika 1. Abdomen ženke, dorzalna perspektiva: A-*M. avidus*, B-*M. moenium*



Slika 2. Abdomen mužjaka, lateralna strana: A-*M. avidus*, B-*M. moenium*.



Slika 3. Noga ženke, lateralna strana: A-*M. avidus* (jesenja generacija), B-*M. avidus* (prolećna generacija), C-*M. moenium*

Tabela 1. Lista jedinki uključenih u analizu 3'COI regiona mtDNK i odgovarajući haplotipovi

uzorak	vrsta	država, lokalitet (mesec i godina uzorkovanja)	Haplotip 3'COI	determinisao	br. u Gen Banci
A22a	<i>M. avidus</i>	Turska	Hap 4	Vujić, A.	-
A25a	<i>M. avidus</i>	Turska	Hap 5	Vujić, A.	-
A27a	<i>M. avidus</i>	Turska	Hap 5	Vujić, A.	-
A29a	<i>M. avidus</i>	Turska	Hap 6	Vujić, A.	-
A32a	<i>M. avidus</i>	Turska	Hap 5	Vujić, A.	-
A4	<i>M. avidus</i>	Hrvatska, Umag (X, 2010)	Hap 7	Vujić, A.	-
A6	<i>M. avidus</i>	Hrvatska, Umag (X, 2010)	Hap 7	Vujić, A.	-
A8	<i>M. avidus</i>	Hrvatska, Umag (X, 2010)	Hap 7	Vujić, A.	-
AU1222	<i>M. avidus</i>	Francuska, Korzika, Tattone (VII, 2011)	Hap 7	Vujić, A.	-
AU1224	<i>M. avidus</i>	Francuska, Korzika, Tattone (VII, 2011)	Hap 7	Vujić, A.	-
AV1	<i>M. moenium</i>	Francuska (VI, 2014)	Hap 59	Vujić, A.	-

AV10	<i>M. avidus</i>	Italija, Veneto, Livenza (VI, 2014)	Hap 8	Vujić, A.	-
AV11	<i>M. moenium</i>	Crna Gora, Durmitor (VI, 2014)	Hap 9	Vujić, A.	-
AV12	<i>M. moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VI, 2014)	Hap 9	Vujić, A.	-
AV13	<i>M. moenium</i>	Srbija, Suva Planina (VI, 2014)	Hap 9	Vujić, A.	-
AV15	<i>M. moenium</i>	Srbija, Suva Planina (VI, 2014)	Hap 60	Vujić, A.	-
AV17	<i>M. avidus</i>	Italija, Perugia (V, 2014)	Hap 9	Vujić, A.	-
AV18	<i>M. avidus</i>	Italija, Perugia (V, 2014)	Hap 7	Vujić, A.	-
AV19	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (V, 2014)	Hap 9	Vujić, A.	-
AV2	<i>M. moenium</i>	Francuska(VI, 2014)	Hap 9	Vujić, A.	-
AV20	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (VI, 2014)	Hap 61	Vujić, A.	-
AV21	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (VI, 2014)	Hap 62	Vujić, A.	-
AV22	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (VI, 2014)	Hap 63	Vujić, A.	-
AV23	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (VI, 2014)	Hap 64	Vujić, A.	-
AV24	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2014)	Hap 10	Vujić, A.	-
AV26	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2014)	Hap 11	Vujić, A.	-
AV27	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2014)	Hap 12	Vujić, A.	-
AV28	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2014)	Hap 7	Vujić, A.	-
AV3	<i>M. moenium</i>	Germany, Baden-Wurttemberg (VI, 2014)	Hap 27	Vujić, A.	-
AV5	<i>M. avidus</i>	Italija, Veneto, Livenza (VI, 2014)	Hap 9	Vujić, A.	-
AV9	<i>M. avidus</i>	Italija, Veneto, Livenza (VI, 2014)	Hap 13	Vujić, A.	-
C17	<i>M. megavidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2010)	Hap 57	Vujić, A.	-
C18	<i>M. megavidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2010)	Hap 57	Vujić, A.	-
C21	<i>M. megavidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2010)	Hap 57	Vujić, A.	-
C98	<i>M. avidus</i>	Grčka, ostrvo Icaria (VI, 2010)	Hap 14	Vujić, A.	-
D10	<i>M. moenium</i>	Crna Gora, Komarnica (VII, 2010)	Hap 9	Vujić, A.	-
D6	<i>M. moenium</i>	Crna Gora, Komarnica (VII, 2010)	Hap 65	Vujić, A.	-
D7	<i>M. moenium</i>	Crna Gora, Komarnica (VII, 2010)	Hap 66	Vujić, A.	-
D8	<i>M. moenium</i>	Crna Gora, Komarnica (VII, 2010)	Hap 13	Vujić, A.	-
D9	<i>M. moenium</i>	Crna Gora, Komarnica (VII, 2010)	Hap 9	Vujić, A.	-
G1167	<i>M. avidus</i>	Italija, Toscana, Parco Regionale (V,2012)	Hap 7	Vujić, A.	-
G1557	<i>M. moenium</i>	Srbija, Suva planina (VII)	Hap 9	Vujić, A.	-
G1592	<i>M. moenium</i>	Srbija, Suva planina (VII)	Hap 9	Vujić, A.	-
G1794	<i>M. Moenium</i>	Srbija, Suva planina (VII)	Hap 9	Vujić, A.	-
G2348	<i>M. avidus</i>	Crna Gora, Orjen (VIII, 2012)	Hap 7	Vujić, A.	-
G2349	<i>M. avidus</i>	Crna Gora, Orjen (VIII, 2012)	Hap 7	Vujić, A.	-
G2350	<i>M. avidus</i>	Grčka, Peloponez (IX, 2012)	Hap 15	Vujić, A.	-
G2351	<i>M. avidus</i>	Grčka, Peloponez (IX, 2012)	Hap 7	Vujić, A.	-
G2366	<i>M. avidus</i>	Grčka, Peloponez (IX, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-
G2368	<i>M. avidus</i>	Grčka, Peloponez (IX, 2012)	Hap 16	Vujić, A.	-
G2527	<i>M. avidus</i>	Grčka, Rodos (X, 2012)	Hap 16	Vujić, A.	-
G2528	<i>M. avidus</i>	Grčka, Rodos (X, 2012)	Hap 5	Vujić, A.	-
G2529	<i>M. avidus</i>	Makedonija, Kožuf (IX, 2012)	Hap 16	Vujić, A.	-

G2620	<i>M. avidus</i>	Bugarska, Pirin (IX, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-
G2621	<i>M. avidus</i>	Bugarska, Pirin (IX, 2012)	Hap 7	Vujić, A.	-
G2622	<i>M. avidus</i>	Bugarska, Pirin (IX, 2012)	Hap 17	Vujić, A.	-
G2626	<i>M. avidus</i>	Bugarska, Pirin (IX, 2012)	Hap 7	Vujić, A.	-
G2627	<i>M. avidus</i>	Bugarska, Pirin (IX, 2012)	Hap 18	Vujić, A.	-
K10	<i>M. moenium</i>	Srbija, Tara (VI, 2010)	Hap 9	Vujić, A.	-
K50	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 9	Vujić, A.	-
K52	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 13	Vujić, A.	-
K54	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 9	Vujić, A.	-
K55	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 9	Vujić, A.	-
K56	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 9	Vujić, A.	-
K59	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 27	Vujić, A.	-
K61	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 9	Vujić, A.	-
K62	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 67	Vujić, A.	-
K63	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 9	Vujić, A.	-
K64	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 27	Vujić, A.	-
K7	<i>M. moenium</i>	Srbija, Tara (VI, 2010)	Hap 59	Vujić, A.	-
K8	<i>M. moenium</i>	Srbija, Tara (VI, 2010)	Hap 64	Vujić, A.	-
K9	<i>M. moenium</i>	Srbija, Tara (VI, 2010)	Hap 68	Vujić, A.	-
KR1	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 1	Vujić, A.	-
KR14	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 2	Vujić, A.	-
KR15	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 2	Vujić, A.	-
KR16	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 2	Vujić, A.	-
KR2	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 2	Vujić, A.	-
KR3	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 2	Vujić, A.	-
KR4	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 3	Vujić, A.	-
L23	<i>M. moenium</i>	Srbija, Stara Planina (VII, 2011)	Hap 27	Vujić, A.	-
L24	<i>M. moenium</i>	Srbija, Stara Planina (VII, 2011)	Hap 69	Vujić, A.	-
L25	<i>M. moenium</i>	Srbija, Stara Planina (VII, 2011)	Hap 9	Vujić, A.	-
L26	<i>M. moenium</i>	Srbija, Stara Planina (VII, 2011)	Hap 9	Vujić, A.	-
L27	<i>M. moenium</i>	Srbija, Stara Planina (VII, 2011)	Hap 70	Vujić, A.	-
L63	<i>M. moenium</i>	Srbija, Vrsacke planine (VII, 2011)	Hap 9	Vujić, A.	-
L64	<i>M. moenium</i>	Srbija, Vrsacke planine (VII, 2011)	Hap 71	Vujić, A.	-
L65	<i>M. moenium</i>	Srbija, Vrsacke planine (VII, 2011)	Hap 72	Vujić, A.	-
L74	<i>M. moenium</i>	Srbija, Vrsacke planine (VII, 2011)	Hap 9	Vujić, A.	-
M17	<i>M. moenium</i>	Hrvatska Velebit, Oštarije (VII, 2011)	Hap 9	Vujić, A.	-
O92	<i>M. avidus</i>	Hrvatska, Velebit, Štirovača (VIII, 2011)	Hap 7	Vujić, A.	-
S409	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (VII, 2001)	Hap 7	Vujić, A.	DQ845132
S524	<i>M. moenium</i>	Francuska (V, 2003)	Hap 27	Vujić, A.	DQ845133
S578	<i>M. moenium</i>	Turska, Erzurum (VII, 2014)	Hap 27	Vujić, A.	-
S76	<i>M. avidus</i>	Srbija, Đerdap (IX, 2011)	Hap 9	Vujić, A.	-

S77	<i>M. avidus</i>	Srbija, Đerdap (IX, 2011)	Hap 7	Vujić, A.	-
S79	<i>M. avidus</i>	Srbija, Đerdap (IX, 2011)	Hap 19	Vujić, A.	-
S90	<i>M. avidus</i>	Srbija, Đerdap (IX, 2011)	Hap 20	Vujić, A.	-
T86	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza mountains (VIII, 2013)	Hap 7	Vujić, A.	-
T87	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza mountains (VIII, 2013)	Hap 21	Vujić, A.	-
T88	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza mountains (VIII, 2013)	Hap 22	Vujić, A.	-
T89	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza mountains (VIII, 2013)	Hap 9	Vujić, A.	-
T90	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza mountains (VIII, 2013)	Hap 23	Vujić, A.	-
TS163	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 56	Vujić, A.	-
TS164	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 45		-
TS165	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 45	Vujić, A.	-
TS166	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 45	Vujić, A.	-
TS167	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 46	Vujić, A.	-
TS168	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 47	Vujić, A.	-
TS170	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 48	Vujić, A.	-
TS171	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 49	Vujić, A.	-
TS172	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 50	Vujić, A.	-
TS173	<i>M. ibericus</i>	Španija, Cadiz (VI, 2014)	Hap 51	Vujić, A.	-
TS174	<i>M. ibericus</i>	Španija, Cadiz (VI, 2014)	Hap 52	Vujić, A.	-
TS175	<i>M. ibericus</i>	Španija, Cadiz (VI, 2014)	Hap 52	Vujić, A.	-
TS176	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 53	Vujić, A.	-
TS178	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 54	Vujić, A.	-
TS179	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 48	Vujić, A.	-
TS 186	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 45	Vujić, A.	-
TS187	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 45	Vujić, A.	-
TS188	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 54	Vujić, A.	-
TS190	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 55	Vujić, A.	-
TS193	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2013)	Hap 9	Vujić, A.	-
TS194	<i>M. moenium</i>	Srbija, Stara Planina (VI, 2013)	Hap 73	Vujić, A.	-
TS195	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fr. Gora (VII, 2013)	Hap 9	Vujić, A.	-
TS198	<i>M. moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VIII, 2013)	Hap 74	Vujić, A.	-
TS200	<i>M. avidus</i>	Italija, Piemonte Cuneo (VII, 2013)	Hap 7	Vujić, A.	-
TS201	<i>M. avidus</i>	Italija Brescia lake Garda (VII, 2013)	Hap 7	Vujić, A.	-
TS202	<i>M. moenium</i>	Italija, Trento Bleggio Superiore (VI, 2013)	Hap 9	Vujić, A.	-
TS203	<i>M. avidus</i>	Italija, Bologna, Castiglione die Pepoli (VII, 2013)	Hap 9	Vujić, A.	-
TS204	<i>M. avidus</i>	Italija, Trento Sarche (VI, 2013)	Hap 9	Vujić, A.	-
TS205	<i>M. avidus</i>	Hrvatska, Umag (VII, 2013)	Hap 7	Vujić, A.	-
TS206	<i>M. moenium</i>	Italija, Bologna, Castiglione die Pepoli (VII, 2013)	Hap 19	Vujić, A.	-
TS207	<i>M. avidus</i>	Grčkaece, Evros Dadia (IX, 2013)	Hap 7	Vujić, A.	-
TS209	<i>M. avidus</i>	Turska, Bozdağ Mountains (VII, 2014)	Hap 24	Vujić, A.	-
U28	<i>M. avidus</i>	Italija, Apeninske planine (V, 2012)	Hap 25	Vujić, A.	-
U4	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza rezervat (VIII, 2013)	Hap 26	Vujić, A.	-
U6	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza rezervat (VIII, 2013)	Hap 5	Vujić, A.	-

U7	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza rezervat (VIII, 2013)	Hap 9	Vujić, A.	-
U8	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza rezervat (VIII, 2013)	Hap 9	Vujić, A.	-
U9	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza rezervat (VIII, 2013)	Hap 27	Vujić, A.	-
V52	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 7	Vujić, A.	-
V53	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 28	Vujić, A.	-
V54	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 7	Vujić, A.	-
V57	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 4	Vujić, A.	-
V58	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 7	Vujić, A.	-
V59	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 5	Vujić, A.	-
V73	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 5	Vujić, A.	-
VM557	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (VI, 1996)	Hap 7	Vujić, A.	DQ845127
VM558	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (VI, 1997)	Hap 49	Vujić, A.	DQ845128
VM560	<i>M. moenium</i>	Makedonija, Mavrovo (VII, 1998)	Hap 75	Vujić, A.	DQ845122
VM561	<i>M. avidus</i>	Grčka, Pindos (V, 1997)	Hap 7	Vujić, A.	DQ845118
VM563	<i>M. moenium</i>	Grčka, Pindos (VII, 1998)	Hap 58	Vujić, A.	DQ845125
VM567	<i>M. avidus</i>	Crna Gora, Morinj (VI, 1998)	Hap 19	Vujić, A.	DQ845110
VM571	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (VI, 1997)	Hap 7	Vujić, A.	DQ845126
VM579	<i>M. avidus</i>	Crna Gora, Morinj (IV, 1997)	Hap 9	Vujić, A.	DQ845113
VM580	<i>M. avidus</i>	Crna Gora, Morinj (IV, 1997)	Hap 29	Vujić, A.	DQ845114
VM581	<i>M. avidus</i>	Crna Gora, Morinj (VI, 1998)	Hap 30	Vujić, A.	DQ845111
VM583	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (VI, 1998)	Hap 9	Vujić, A.	DQ845129
VM589	<i>M. moenium</i>	Crna Gora, Durmitor (VI, 1998)	Hap 9	Vujić, A.	DQ845120
VM590	<i>M. moenium</i>	Crna Gora, Durmitor (VI, 1997)	Hap 9	Vujić, A.	DQ845119
VM605	<i>M. moenium</i>	Crna Gora, Durmitor (VI, 1998)	Hap 76	Vujić, A.	DQ845121
VM615	<i>M. avidus</i>	Srbija, Dubašnica (IX, 1997)	Hap 9	Vujić, A.	DQ845115
VM616	<i>M. avidus</i>	Srbija, Dubašnica (IX, 1997)	Hap 7	Vujić, A.	DQ845116
VM823	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (IV, 2001)	Hap 9	Vujić, A.	DQ845130
VM824	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (IV, 2001)	Hap 19	Vujić, A.	DQ845131
W18	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-
W19	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2012)	Hap 7	Vujić, A.	-
W20	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2012)	Hap 7	Vujić, A.	-
W21	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2012)	Hap 31	Vujić, A.	-
W22	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-
W88	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 77	Vujić, A.	-
W89	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 78	Vujić, A.	-
W90	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 13	Vujić, A.	-
W91	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 27	Vujić, A.	-
W92	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 79	Vujić, A.	-
X2	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-
X26	<i>M. moenium</i>	Montenegro, Durmior (VI, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-
X27	<i>M. moenium</i>	Montenegro, Durmior (VI, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-
X28	<i>M. moenium</i>	Montenegro, Durmior (VI, 2012)	Hap 17	Vujić, A.	-
X3	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-
X4	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 27	Vujić, A.	-
X5	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-

X82	<i>M. moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VI, 2012)	Hap 80	Vujić, A.	-
X84	<i>M. moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VI, 2012)	Hap 58	Vujić, A.	-
X85	<i>M. moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VI, 2012)	Hap 65	Vujić, A.	-
X86	<i>M. moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VI, 2012)	Hap 64	Vujić, A.	-
X98	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-
X99	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-
Y1	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-
Y1158	<i>M. avidus</i>	Grčka, Tesalija, Magnisias, Platania, Volos (V, 2009)	Hap 7	Vujić, A.	-
Y1159	<i>M. avidus</i>	Grčka, Tesalija, Magnisias, Platania, Volos (V, 2009)	Hap 9	Vujić, A.	-
Y1160	<i>M. avidus</i>	Grčka, Tesalija, Magnisias, Platania, Volos (V, 2009)	Hap 32	Vujić, A.	-
Y1161	<i>M. avidus</i>	Grčka, Tesalija, Magnisias, Platania, Volos (V, 2009)	Hap 7	Vujić, A.	-
Y1162	<i>M. avidus</i>	Grčka, Tesalija, Magnisias, Platania, Volos (V, 2009)	Hap 33	Vujić, A.	-
Y1163	<i>M. avidus</i>	Grčka, Tesalija, Magnisias, Platania, Volos (V, 2009)	Hap 9	Vujić, A.	-
Y1164	<i>M. avidus</i>	Grčka, Tesalija, Magnisias, Platania, Volos (V, 2009)	Hap 34	Vujić, A.	-
Y1206	<i>M. avidus</i>	Grčka (V)	Hap 35	Vujić, A.	-
Y1208	<i>M. avidus</i>	Grčka (V)	Hap 19	Vujić, A.	-
Y1213	<i>M. avidus</i>	Grčka (V)	Hap 7	Vujić, A.	-
Y1637	<i>M. avidus</i>	Grčka (V)	Hap 36	Vujić, A.	-
Y1638	<i>M. avidus</i>	Grčka (V)	Hap 31	Vujić, A.	-
Y1639	<i>M. avidus</i>	Grčka (V)	Hap 37	Vujić, A.	-
Y2	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 27	Vujić, A.	-
Y3	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 81	Vujić, A.	-
Y394	<i>M. moenium</i>	Italija (VII)	Hap 9	Vujić, A.	-
Y552	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (V, 2001)	Hap 38	Vujić, A.	-
Y553	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (V, 2001)	Hap 17	Vujić, A.	-
Y554	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (V, 2001)	Hap 17	Vujić, A.	-
Y555	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (V, 2001)	Hap 9	Vujić, A.	-
Y556	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (V, 2001)	Hap 31	Vujić, A.	-
Y557	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (V, 2001)	Hap 7	Vujić, A.	-
Y558	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (V, 2001)	Hap 7	Vujić, A.	-
Y559	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (V, 2001)	Hap 31	Vujić, A.	-
Y560	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (V, 2001)	Hap 9	Vujić, A.	-
Y561	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (V, 2001)	Hap 39	Vujić, A.	-
Y562	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (V, 2001)	Hap 7	Vujić, A.	-
Y565	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (V, 2001)	Hap 40	Vujić, A.	-
Y592	<i>M. avidus</i>	ITS (VI)	Hap 41	Vujić, A.	-
Y940	<i>M. avidus</i>	Grčka (V)	Hap 7	Vujić, A.	-
Y941	<i>M. avidus</i>	Grčka (V)	Hap 7	Vujić, A.	-
Y942	<i>M. avidus</i>	Grčka (V)	Hap 42	Vujić, A.	-
Y943	<i>M. avidus</i>	Grčka (V)	Hap 43	Vujić, A.	-
Y944	<i>M. avidus</i>	Grčka (V)	Hap 7	Vujić, A.	-

Z60	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (VII, 2014)	Hap 7	Vujić, A.	-
Z64	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (VII, 2014)	Hap 7	Vujić, A.	-
Z65	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (VII, 2014)	Hap 44	Vujić, A.	-
Z66	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos (VII, 2014)	Hap 30	Vujić, A.	-
20140	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 82	Vujić, A.	-
20159	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 9	Vujić, A.	-
20160	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 83	Vujić, A.	-
20165	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 9	Vujić, A.	-
20175	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 9	Vujić, A.	-
20187	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 9	Vujić, A.	-
07069	<i>M. ibericus</i>	Maroko, Middle Atlas, Azrou, Cedar Forest (VI, 2014)	Hap 84	Vujić, A.	-
15704	<i>M. avidus</i>	Grčka, Peloponez, blizu Mainalon ski center (VI, 2017)	Hap 85	Vujić, A.	-
15715	<i>M. aff. moenium</i>	Grčka, Peloponez, blizu Falanthos (VI, 2017)	Hap 2	Vujić, A.	-
15716	<i>M. aff. moenium</i>	Grčka, Peloponez, blizu Falanthos (VI, 2017)	Hap 2	Vujić, A.	-
15745	<i>M. aff. moenium</i>	Grčka, Evia, Ano Davia (VI, 2017)	Hap 3	Vujić, A.	-
15892	<i>M. avidus</i>	Grčka, Evia, blizu Dasos Stenis 2 (VI, 2017)	Hap 7	Vujić, A.	-
16536	<i>M. moenium</i>	Francuska, Korzika, blizu U Pirellu (V, 2017)	Hap 86	Vujić, A.	-
17754	<i>M. avidus</i>	Francuska, Korzika, Asco 1 (V, 2017)	Hap 87	Vujić, A.	-
17755	<i>M. avidus</i>	Francuska, Korzika, Asco 1 (V, 2017)	Hap 19	Vujić, A.	-

Tabela 2. Lista jedinki uključenih u analizu 5'COI regiona mtDNK i odgovarajući haplotipovi

uzorak	vrsta	država, lokalitet (mesec i godina uzorkovanja)	Haplotip 5'COI	determinisao	br. u Gen Banci
A4	<i>M. avidus</i>	Hrvatska, Umag (X, 2010)	Hap 10	Vujić, A.	-
A6	<i>M. avidus</i>	Hrvatska, Umag (X, 2010)	Hap 11	Vujić, A.	-
A8	<i>M. avidus</i>	Hrvatska, Umag (X, 2010)	Hap 5	Vujić, A.	-
AU1222	<i>M. avidus</i>	Francuska, Korzika, Tattone (VII.2011)	Hap 36	Vujić, A.	-
AU1224	<i>M. avidus</i>	Francuska, Korzika, Tattone (VII.2011)	Hap 37	Vujić, A.	-
AU1225	<i>M. avidus</i>	Francuska, Korzika, Tattone (VII.2011)	Hap 12	Vujić, A.	-
AV1	<i>M. moenium</i>	Francuska (VI, 2014)	Hap 57	Vujić, A.	-
AV10	<i>M. avidus</i>	Italija, Veneto, Livenza (VI, 2014)	Hap 13	Vujić, A.	-
AV17	<i>M. avidus</i>	Italija, Perugia (V, 2014)	Hap 14	Vujić, A.	-

AV18	<i>M. avidus</i>	Italija, Perugia (V, 2014)	Hap 15	Vujić, A.	-
AV19	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (V, 2014)	Hap 20	Vujić, A.	-
AV2	<i>M. moenium</i>	Francuska(VI, 2014)	Hap 58	Vujić, A.	-
AV21	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (VI, 2014)	Hap 59	Vujić, A.	-
AV22	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (VI, 2014)	Hap 14	Vujić, A.	-
AV23	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (VI, 2014)	Hap 60	Vujić, A.	-
AV24	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2014)	Hap 16	Vujić, A.	-
AV26	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2014)	Hap 17	Vujić, A.	-
AV27	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2014)	Hap 18	Vujić, A.	-
AV28	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2014)	Hap 13	Vujić, A.	-
AV3	<i>M. moenium</i>	Germany, Baden-Wurtemberg (VI, 2014)	Hap 61	Vujić, A.	-
AV5	<i>M. avidus</i>	Italija, Veneto, Livenza (VI, 2014)	Hap 19	Vujić, A.	-
AV9	<i>M. avidus</i>	Italija, Veneto, Livenza (VI, 2014)	Hap 9	Vujić, A.	-
B14	<i>M. moenium</i>	Crna Gora, Durmitor (VII, 2014)	Hap 62	Vujić, A.	KT731129
K52	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 63	Vujić, A.	-
K54	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 64	Vujić, A.	-
K55	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 25	Vujić, A.	-
K56	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 65	Vujić, A.	-
K59	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 14	Vujić, A.	-
K61	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 31	Vujić, A.	-
K62	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 66	Vujić, A.	-
K63	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 67	Vujić, A.	-
K64	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 31	Vujić, A.	-
KR1	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 1	Vujić, A.	-
KR14	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 2	Vujić, A.	-
KR15	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 1	Vujić, A.	-
KR16	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 3	Vujić, A.	-
KR2	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 1	Vujić, A.	-
KR3	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 1	Vujić, A.	-
KR4	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 4	Vujić, A.	-
L63	<i>M. moenium</i>	Srbija, Vrsacke planine (VII, 2011)	Hap 68	Vujić, A.	-
L64	<i>M. moenium</i>	Srbija, Vrsacke planine (VII, 2011)	Hap 13	Vujić, A.	-

L65	<i>M. moenium</i>	Srbija, Vrsacke planine (VII, 2011)	Hap 69	Vujić, A.	-
L74	<i>M. moenium</i>	Srbija, Vrsacke planine (VII, 2011)	Hap 9	Vujić, A.	-
S75	<i>M. avidus</i>	Srbija, Đerdap (IX, 2011)	Hap 5	Vujić, A.	-
S76	<i>M. avidus</i>	Srbija, Đerdap (IX, 2011)	Hap 20	Vujić, A.	-
S79	<i>M. avidus</i>	Srbija, Đerdap (IX, 2011)	Hap 9	Vujić, A.	-
T86	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza mountains (VIII, 2013)	Hap 21	Vujić, A.	-
T87	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza mountains (VIII, 2013)	Hap 9	Vujić, A.	-
T88	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza mountains (VIII, 2013)	Hap 22	Vujić, A.	-
T89	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza mountains (VIII, 2013)	Hap 23	Vujić, A.	-
T90	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza mountains (VIII, 2013)	Hap 24	Vujić, A.	-
7083/TS163	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 38	Vujić, A.	KT731111
7092/TS164	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 39	Vujić, A.	KT731112
7103/TS165	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 40	Vujić, A.	KT731115
7098/TS166	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 41	Vujić, A.	KT731114
7096/TS167	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 42	Vujić, A.	KT731113
7319/TS168	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 43	Vujić, A.	KT731119
7413/TS169	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 44	Vujić, A.	KT731117
7380/TS170	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 45	Vujić, A.	KT731117
7320/TS171	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 46	Vujić, A.	KT731116
7376/TS172	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 47	Vujić, A.	KT731121
7115/TS173	<i>M. ibericus</i>	Španija, Cadiz (VI, 2014)	Hap 48	Vujić, A.	KT731116
7212/TS174	<i>M. ibericus</i>	Španija, Cadiz (VI, 2014)	Hap 49	Vujić, A.	KT731117
7158/TS175	<i>M. ibericus</i>	Španija, Cadiz (VI, 2014)	Hap 49	Vujić, A.	KT731117
7254/TS176	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 50	Vujić, A.	KT731118
7352/TS177	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 51	Vujić, A.	KT731120
7286/TS178	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 52	Vujić, A.	KT731118
7264/TS179	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 45	Vujić, A.	KT731110
7049/TS186	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 53	Vujić, A.	KT731107
7058/TS187	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 54	Vujić, A.	KT731108
7077/TS188	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 55	Vujić, A.	KT731109
7078/TS189	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 56	Vujić, A.	KT731110
7076/TS190	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 55	Vujić, A.	KT731109
Ć1/TS192	<i>M. avidus</i>	Srbija, Malinik (V, 2013)	Hap 25	Vujić, A.	KT731130

Ć12 /TS193	<i>M.moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2013)	Hap 9	Vujić, A.	KT731124
Ć19/TS194	<i>M.moenium</i>	Srbija, Stara Planina (VI, 2013)	Hap 25	Vujić, A.	KT731129
Ć80/TS195	<i>M.moenium</i>	Srbija, Fr.Gora (VII, 2013)	Hap 70	Vujić, A.	KT731132
S82/TS197	<i>M. avidus</i>	Italija Brescia lake Garda (VII, 2013)	Hap 21	Vujić, A.	KT731126
AE12/TS198	<i>M.moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VIII, 2013)	Hap 9	Vujić, A.	KT731124
AD80/TS199	<i>M.moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VIII, 2013)	Hap 71	Vujić, A.	KT731124
Ć51/TS200	<i>M. avidus</i>	Italija, Piemonte Cuneo (VII, 2013)	Hap 26	Vujić, A.	KT731125
Ć49/TS201	<i>M. avidus</i>	Italija Brescia lake Garda (VII, 2013)	Hap 13	Vujić, A.	KT731126
AB14/TS202	<i>M.moenium</i>	Italija, Trento Bleggio Superiore (VI, 2013)	Hap 9	Vujić, A.	KT731122
Ć43/TS204	<i>M. avidus</i>	Italija, Trento Sarche (VI, 2013)	Hap 27	Vujić, A.	KT731131
Ć34/TS205	<i>M. avidus</i>	Hrvatska, Umag (VII, 2013)	Hap 21	Vujić, A.	KT731126
AB26/TS206	<i>M.moenium</i>	Italija, Bologna Castiglione die Pepoli (VII, 2013)	Hap 72	Vujić, A.	KT731123
AI8/TS207	<i>M. avidus</i>	Grčka, Evros Dadia (IX, 2013)	Hap 5	Vujić, A.	KT731127
AH99/TS208	<i>M. avidus</i>	Turska, Baffa (IX, 2013)	Hap 28	Vujić, A.	KT731126
6942/TS209	<i>M. avidus</i>	Turska, Bozdağ Mountains (IX, 2013)	Hap 29	Vujić, A.	KT731106
U4	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza rezervat (VIII, 2013)	Hap 30	Vujić, A.	-
U7	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza rezervat (VIII, 2013)	Hap 23	Vujić, A.	-
U8	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza rezervat (VIII, 2013)	Hap 14	Vujić, A.	-
U9	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza rezervat (VIII, 2013)	Hap 31	Vujić, A.	-
V53	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 32	Vujić, A.	-
V54	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 5	Vujić, A.	-
V58	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 6	Vujić, A.	-
V59	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 7	Vujić, A.	-
V60	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 8	Vujić, A.	-
V73	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-
W18	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2012)	Hap 21	Vujić, A.	-
W19	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2012)	Hap 21	Vujić, A.	-
W20	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2012)	Hap 21	Vujić, A.	-
W21	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2012)	Hap 33	Vujić, A.	-
W22	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2012)	Hap 34	Vujić, A.	-
W88	<i>M.moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-
W89	<i>M.moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 31	Vujić, A.	-
W90	<i>M.moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 73	Vujić, A.	-
W91	<i>M.moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 31	Vujić, A.	-
X2	<i>M.moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 74	Vujić, A.	-

X28	<i>M. moenium</i>	Montenegro, Durmitor (VI, 2012)	Hap 70	Vujić, A.	-
X3	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-
X4	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 75	Vujić, A.	-
X5	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 25	Vujić, A.	-
X82	<i>M. moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VI, 2012)	Hap 25	Vujić, A.	-
X83	<i>M. moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VI, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-
X84	<i>M. moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VI, 2012)	Hap 76	Vujić, A.	-
X85	<i>M. moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VI, 2012)	Hap 31	Vujić, A.	-
X86	<i>M. moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VI, 2012)	Hap 31	Vujić, A.	-
Y1	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 9	Vujić, A.	-
Y2	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 31	Vujić, A.	-
Z59	<i>M. avidus</i>	Grčka, Lezbos(VII, 2014)	Hap 35	Vujić, A.	-
20140	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 31	Vujić, A.	-
20159	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 77	Vujić, A.	-
20160	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 78	Vujić, A.	-
20165	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 79	Vujić, A.	-
20175	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 77	Vujić, A.	-
20187	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 80	Vujić, A.	-
07069	<i>M.ibericus</i>	Maroko , Middle Atlas, Azrou, Cedar Forest (VI, 2014)	Hap 81	Vujić, A.	-
15704	<i>M. avidus</i>	Grčka, Peloponez, blizu Mainalon ski center (VI, 2017)	Hap 21	Vujić, A.	-
15715	<i>M. aff. moenium</i>	Grčka, Peloponez, blizu Falanthos (VI, 2017)	Hap 82	Vujić, A.	-
15716	<i>M. aff. moenium</i>	Grčka, Peloponez, blizu Falanthos (VI, 2017)	Hap 82	Vujić, A.	-
15745	<i>M. aff. moenium</i>	Grčka, Evia, Ano Davia (VI, 2017)	Hap 82	Vujić, A.	-
16536	<i>M. moenium</i>	Francuska, Korzika, blizu U Pirellu (V, 2017)	Hap 70	Vujić, A.	-
17754	<i>M. avidus</i>	Francuska, Korzika, Asco 1(V, 2017)	Hap 83	Vujić, A.	-
17755	<i>M. avidus</i>	Francuska, Korzika, Asco 1(V, 2017)	Hap 70	Vujić, A.	-

Tabela 3. Lista jedinki uključenih u analizu ukupnog COI gena mtDNK i odgovarajući haplotipovi

uzorak	vrsta	država, lokalitet (mesec i godina uzorkovanja)	Haplotip	determinisao
A4	<i>M. avidus</i>	Hrvatska, Umag (X, 2010)	Hap 10	Vujić, A.
A6	<i>M. avidus</i>	Hrvatska, Umag (X, 2010)	Hap 11	Vujić, A.
A8	<i>M. avidus</i>	Hrvatska, Umag (X, 2010)	Hap 6	Vujić, A.
AU1222	<i>M. avidus</i>	Francuska, Korzika, Tattone (VII, 2011)	Hap 33	Vujić, A.
AU1224	<i>M. avidus</i>	Francuska, Korzika, Tattone (VII, 2011)	Hap 34	Vujić, A.
AV1	<i>M. moenium</i>	Francuska(VI, 2014)	Hap 49	Vujić, A.
AV10	<i>M. avidus</i>	Italija, Veneto, Livenza (VI, 2014)	Hap 12	Vujić, A.
AV17	<i>M. avidus</i>	Italija, Perugia (V, 2014)	Hap 13	Vujić, A.
AV18	<i>M. avidus</i>	Italija, Perugia (V, 2014)	Hap 10	Vujić, A.
AV19	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (V, 2014)	Hap 17	Vujić, A.
AV2	<i>M. moenium</i>	Francuska(VI, 2014)	Hap 50	Vujić, A.
AV21	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (VI, 2014)	Hap 51	Vujić, A.
AV22	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (VI, 2014)	Hap 52	Vujić, A.
AV23	<i>M. moenium</i>	Srbija, Dubašnica (VI, 2014)	Hap 53	Vujić, A.
AV24	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2014)	Hap 14	Vujić, A.
AV26	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2014)	Hap 15	Vujić, A.
AV27	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2014)	Hap 16	Vujić, A.
AV28	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2014)	Hap 17	Vujić, A.
AV3	<i>M. moenium</i>	Nemačka, Baden-Wurtemberg (VI, 2014)	Hap 54	Vujić, A.
AV5	<i>M. avidus</i>	Italija, Veneto, Livenza (VI, 2014)	Hap 18	Vujić, A.
AV9	<i>M. avidus</i>	Italija, Veneto, Livenza (VI, 2014)	Hap 20	Vujić, A.
K52	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 55	Vujić, A.
K54	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 56	Vujić, A.
K55	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 57	Vujić, A.
K56	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 58	Vujić, A.
K59	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 13	Vujić, A.
K61	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 13	Vujić, A.
K62	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 59	Vujić, A.
K63	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 60	Vujić, A.
K64	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fruška Gora (VI, 2011)	Hap 13	Vujić, A.
KR1	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 1	Vujić, A.
KR14	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 2	Vujić, A.
KR15	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 1	Vujić, A.
KR16	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 3	Vujić, A.
KR2	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 1	Vujić, A.

KR3	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 1	Vujić, A.
KR4	<i>M. aff. moenium</i>	Krf (VI, 2017)	Hap 4	Vujić, A.
L63	<i>M. moenium</i>	Srbija, Vrsacke planine (VII, 2011)	Hap 61	Vujić, A.
L64	<i>M. moenium</i>	Srbija, Vrsacke planine (VII, 2011)	Hap 62	Vujić, A.
L65	<i>M. moenium</i>	Srbija, Vrsacke planine (VII, 2011)	Hap 63	Vujić, A.
L74	<i>M. moenium</i>	Srbija, Vrsacke planine (VII, 2011)	Hap 58	Vujić, A.
S76	<i>M. avidus</i>	Srbija, Đerdap (IX, 2011)	Hap 20	Vujić, A.
S79	<i>M. avidus</i>	Srbija, Đerdap (IX, 2011)	Hap 21	Vujić, A.
T86	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza mountains (VIII, 2013)	Hap 17	Vujić, A.
T87	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza mountains (VIII, 2013)	Hap 22	Vujić, A.
T88	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza mountains (VIII, 2013)	Hap 23	Vujić, A.
T89	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza mountains (VIII, 2013)	Hap 24	Vujić, A.
T90	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza mountains (VIII, 2013)	Hap 25	Vujić, A.
TS163	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 35	Vujić, A.
TS165	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 36	Vujić, A.
TS166	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 37	Vujić, A.
TS167	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 38	Vujić, A.
TS168	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 39	Vujić, A.
TS170	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 40	Vujić, A.
TS171	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 41	Vujić, A.
TS172	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 42	Vujić, A.
TS173	<i>M. ibericus</i>	Španija, Cadiz (VI, 2014)	Hap 43	Vujić, A.
TS174	<i>M. ibericus</i>	Španija, Cadiz (VI, 2014)	Hap 44	Vujić, A.
TS175	<i>M. ibericus</i>	Španija, Cadiz (VI, 2014)	Hap 44	Vujić, A.
TS176	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 45	Vujić, A.
TS178	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 45	Vujić, A.
TS179	<i>M. ibericus</i>	Španija, Sierra Nevada (VI, 2014)	Hap 40	Vujić, A.
TS187	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 46	Vujić, A.
TS188	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 47	Vujić, A.
TS190	<i>M. ibericus</i>	Španija, Maroko (VI, 2014)	Hap 48	Vujić, A.
TS193	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2013)	Hap 64	Vujić, A.
TS194	<i>M. moenium</i>	Srbija, Stara Planina (VI, 2013)	Hap 65	Vujić, A.
TS195	<i>M. moenium</i>	Srbija, Fr. Gora (VII, 2013)	Hap 66	Vujić, A.
TS198	<i>M. moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VIII, 2013)	Hap 67	Vujić, A.
TS200	<i>M. avidus</i>	Italija, Piemonte Cuneo (VII, 2013)	Hap 10	Vujić, A.
TS201	<i>M. avidus</i>	Italija, Brescia lake Garda (VII, 2013)	Hap 17	Vujić, A.
TS202	<i>M. moenium</i>	Italija, Trento Bleggio Superiore (VI, 2013)	Hap 58	Vujić, A.
TS204	<i>M. avidus</i>	Italija, Trento Sarche (VI, 2013)	Hap 26	Vujić, A.
TS205	<i>M. avidus</i>	Hrvatska, Umag (VII, 2013)	Hap 17	Vujić, A.
TS206	<i>M. moenium</i>	Italija, Bologna Castiglione dei Pepoli (VII, 2013)	Hap 68	Vujić, A.
TS207	<i>M. avidus</i>	Grčka, Evros Dadia (IX, 2013)	Hap 6	Vujić, A.
TS209	<i>M. avidus</i>	Turska, Bozdağ Mountains (VII, 2014)	Hap 27	Vujić, A.
U4	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza rezervat (VIII, 2013)	Hap 28	Vujić, A.
U7	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza rezervat (VIII, 2013)	Hap 24	Vujić, A.

U8	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza rezervat (VIII, 2013)	Hap 29	Vujić, A.
U9	<i>M. avidus</i>	Italija, Piza rezervat (VIII, 2013)	Hap 13	Vujić, A.
V53	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 5	Vujić, A.
V54	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 6	Vujić, A.
V58	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 7	Vujić, A.
V59	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 8	Vujić, A.
V73	<i>M. avidus</i>	Grčka, Samos (VI, 2012)	Hap 9	Vujić, A.
W18	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2012)	Hap 30	Vujić, A.
W19	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2012)	Hap 17	Vujić, A.
W20	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2012)	Hap 17	Vujić, A.
W21	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2012)	Hap 31	Vujić, A.
W22	<i>M. avidus</i>	Srbija, Pčinja (VI, 2012)	Hap 32	Vujić, A.
W88	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 69	Vujić, A.
W89	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 70	Vujić, A.
W90	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 71	Vujić, A.
W91	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 13	Vujić, A.
X2	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 72	Vujić, A.
X28	<i>M. moenium</i>	Montenegro, Durmior (VI, 2012)	Hap 73	Vujić, A.
X3	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 74	Vujić, A.
X4	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 75	Vujić, A.
X5	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 66	Vujić, A.
X82	<i>M. moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VI, 2012)	Hap 76	Vujić, A.
X84	<i>M. moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VI, 2012)	Hap 77	Vujić, A.
X85	<i>M. moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VI, 2012)	Hap 78	Vujić, A.
X86	<i>M. moenium</i>	Srbija, Kopaonik (VI, 2012)	Hap 79	Vujić, A.
Y1	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 58	Vujić, A.
Y2	<i>M. moenium</i>	Srbija, Đerdap (VI, 2012)	Hap 13	Vujić, A.
20140	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 83	Vujić, A.
20159	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 84	Vujić, A.
20160	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 85	Vujić, A.
20165	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 80	Vujić, A.
20175	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 81	Vujić, A.
20187	<i>M. moenium</i>	Poljska (VII, 2018)	Hap 82	Vujić, A.
07069	<i>M. ibericus</i>	Maroko, Middle Atlas, Azrou, Cedar Forest (VI, 2014)	Hap 86	Vujić, A.
15704	<i>M. avidus</i>	Grčka, Peloponez, blizu Mainalon (VI, 2017)	Hap 87	Vujić, A.
15715	<i>M. aff. moenium</i>	Grčka, Peloponez, blizu Falanthos (VI, 2017)	Hap 88	Vujić, A.
15716	<i>M. aff. moenium</i>	Grčka, Peloponez, blizu Falanthos (VI, 2017)	Hap 88	Vujić, A.
15745	<i>M. aff. moenium</i>	Grčka, Evia, Ano Davia (VI, 2017)	Hap 88	Vujić, A.
16536	<i>M. moenium</i>	Francuska, Korzika, blizu U Pirellu (V, 2017)	Hap 89	Vujić, A.
17754	<i>M. avidus</i>	Francuska, Korzika, Asco 1(V, 2017)	Hap 90	Vujić, A.
17755	<i>M. avidus</i>	Francuska, Korzika, Asco 1(V, 2017)	Hap 91	Vujić, A.

Tabela 4. Lista uzoraka koršćenih u analizi alozimske varijabilnosti

ID	vrsta	država	lokalitet	datum	uzorkovao	determinisao
Ć1	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Malinik	24/05/2013	Vujić A., Likov L., Miličić M.	Vujić A.
Ć2	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Malinik	24/05/2013	Vujić A., Likov L., Miličić M.	Vujić A.
Ć3	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Malinik	24/05/2013	Vujić A., Likov L., Miličić M.	Vujić A.
Ć4	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Malinik	24/05/2013	Vujić A., Likov L., Miličić M.	Vujić A.
Ć5	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Malinik	24/05/2013	Vujić A., Likov L., Miličić M.	Vujić A.
Ć6	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Malinik	24/05/2013	Vujić A., Likov L., Miličić M.	Vujić A.
Ć7	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Malinik	24/05/2013	Vujić A., Likov L., Miličić M.	Vujić A.
Ć8	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Malinik	24/05/2013	Vujić A., Likov L., Miličić M.	Vujić A.
Ć9	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Malinik	24/05/2013	Vujić A., Likov L.	Vujić A.
Ć10	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Malinik	24/05/2013	Vujić A., Likov L., Miličić M.	Vujić A.
Ć11	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Đerdap	03/06/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć12	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Đerdap	03/06/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć13	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Đerdap	03/06/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć14	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Đerdap	03/06/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć15	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Đerdap	03/06/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć16	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Đerdap	03/06/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć18	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Stara planina	02/06/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć19	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Stara planina	02/06/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć20	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Stara planina	02/06/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć21	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Stara planina	02/06/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć22	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Stara planina	02/06/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć72	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Fruška Gora	02/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć73	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Fruška Gora	02/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć74	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Fruška Gora	02/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć75	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Fruška Gora	02/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć76	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Fruška Gora	02/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć77	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Fruška Gora	02/07/2013	Vujić A.	Vujić A.

Ć78	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Fruška Gora	02/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć79	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Fruška Gora	02/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć80	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Fruška Gora	02/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
Ć81	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Fruška Gora	02/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
AD96	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Kopaonik	17/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AD97	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Kopaonik	17/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AD98	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Kopaonik	17/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AD99	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Kopaonik	17/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AE8	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Kopaonik	17/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AE9	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Kopaonik	17/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AE10	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Kopaonik	17/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AE11	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Kopaonik	17/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AE12	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Kopaonik	17/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AE13	<i>Merodon moenium</i>	Srbija	Kopaonik	17/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
S80	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Đerdap	01/09/2011	Vujić A.	Vujić A.
S82	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Đerdap	01/09/2011	Vujić A.	Vujić A.
S86	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Đerdap	01/09/2011	Vujić A.	Vujić A.
S87	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Đerdap	01/09/2011	Vujić A.	Vujić A.
S89	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Đerdap	01/09/2011	Vujić A.	Vujić A.
AE35	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Dubašnica	20/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AE36	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Dubašnica	20/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AE37	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Dubašnica	20/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AE38	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Dubašnica	20/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AE39	<i>Merodon avidus</i>	Srbija	Dubašnica	20/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AD89	<i>Merodon moenium</i>	Crna Gora	Durmitor	10/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AD90	<i>Merodon moenium</i>	Crna Gora	Durmitor	10/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AD91	<i>Merodon moenium</i>	Crna Gora	Durmitor	10/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AD92	<i>Merodon moenium</i>	Crna Gora	Durmitor	10/08/2013	Vujić A.	Vujić A.
AD93	<i>Merodon moenium</i>	Crna Gora	Durmitor	10/08/2013	Vujić A.	Vujić A.

AD79	<i>Merodon moenium</i>	Crna Gora	Orijen	27/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
AD80	<i>Merodon moenium</i>	Crna Gora	Orijen	27/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
AD81	<i>Merodon moenium</i>	Crna Gora	Orijen	27/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
AD82	<i>Merodon moenium</i>	Crna Gora	Orijen	27/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
AD83	<i>Merodon moenium</i>	Crna Gora	Orijen	27/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
Č50	<i>Merodon avidus</i>	Italija	Piemonte	08/06/2013	Vujić A., Ačanski J.	Vujić A.
Č51	<i>Merodon avidus</i>	Italija	Piemonte	08/06/2013	Vujić A., Ačanski J.	Vujić A.
Č52	<i>Merodon avidus</i>	Italija	Piemonte	08/06/2013	Vujić A., Ačanski J.	Vujić A.
Č53	<i>Merodon avidus</i>	Italija	Piemonte	08/06/2013	Vujić A., Ačanski J.	Vujić A.
Č54	<i>Merodon avidus</i>	Italija	Piemonte	08/06/2013	Vujić A., Ačanski J.	Vujić A.
Č46	<i>Merodon avidus</i>	Italija	lake Garda, Brescia	06/06/2013	Vujić A., Ačanski J., Nedeljković Z.	Vujić A.
Č47	<i>Merodon avidus</i>	Italija	lake Garda, Brescia	06/06/2013	Vujić A., Ačanski J., Nedeljković Z.	Vujić A.
Č49	<i>Merodon avidus</i>	Italija	lake Garda, Brescia	06/06/2013	Vujić A., Ačanski J., Nedeljković Z.	Vujić A.
Č63	<i>Merodon avidus</i>	Italija	lake Garda, Brescia	06/06/2013	Vujić A., Ačanski J., Nedeljković Z.	Vujić A.
AB14	<i>Merodon moenium</i>	Italija	Bleggio Superiore	16/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
AB15	<i>Merodon moenium</i>	Italija	Bleggio Superiore	16/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
AB16	<i>Merodon moenium</i>	Italija	Bleggio Superiore	16/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
AB17	<i>Merodon moenium</i>	Italija	Bleggio Superiore	16/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
AB18	<i>Merodon moenium</i>	Italija	Bleggio Superiore	16/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
AB19	<i>Merodon moenium</i>	Italija	Bleggio Superiore	16/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
AB23	<i>Merodon moenium</i>	Italija	Bologna, Monte Baducco	16/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
AB25	<i>Merodon moenium</i>	Italija	Bologna, Monte Baducco	16/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
AB26	<i>Merodon moenium</i>	Italija	Bologna, Monte Baducco	16/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
AB27	<i>Merodon moenium</i>	Italija	Bologna, Monte Baducco	16/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
AB24	<i>Merodon moenium</i>	Italija	Bologna, M. Baducco	16/07/2013	Vujić A.	Vujić A.

AB29	<i>Merodon moenium</i>	Italija	Bologna, Monte Baducco	16/07/2013	Vujić A.	Vujić A.
Č42	<i>Merodon avidus</i>	Italija	Trento Sarche	05/06/2013	Vujić A., Ačanski J., Nedeljković Z.	Vujić A.
Č43	<i>Merodon avidus</i>	Italy	Trento Sarche	05/06/2013	Vujić A., Ačanski J., Nedeljković Z.	Vujić A.
Č44	<i>Merodon avidus</i>	Italy	Trento Sarche	05/06/2013	Vujić A., Ačanski J., Nedeljković Z.	Vujić A.
Č45	<i>Merodon avidus</i>	Italy	Trento Sarche	05/06/2013	Vujić A., Ačanski J., Nedeljković Z.	Vujić A.
Č32	<i>Merodon avidus</i>	Hrvatska	Umag	04/06/2013	Vujić A., Ačanski J., Nedeljković Z.	Vujić A.
Č33	<i>Merodon avidus</i>	Hrvatska	Umag	04/06/2013	Vujić A., Ačanski J., Nedeljković Z.	Vujić A.
Č34	<i>Merodon avidus</i>	Hrvatska	Umag	04/06/2013	Vujić A., Ačanski J., Nedeljković Z.	Vujić A.
Č35	<i>Merodon avidus</i>	Hrvatska	Umag	04/06/2013	Vujić A., Ačanski J., Nedeljković Z.	Vujić A.
Č36	<i>Merodon avidus</i>	Hrvatska	Umag	04/06/2013	Vujić A., Ačanski J., Nedeljković Z.	Vujić A.
Č37	<i>Merodon avidus</i>	Hrvatska	Umag	04/06/2013	Vujić A., Ačanski J., Nedeljković Z.	Vujić A.
Č38	<i>Merodon avidus</i>	Hrvatska	Umag	04/06/2013	Vujić A., Ačanski J., Nedeljković Z.	Vujić A.
AH25	<i>Merodon avidus</i>	Hrvatska	Umag	09/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AH26	<i>Merodon avidus</i>	Hrvatska	Umag	09/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AH27	<i>Merodon avidus</i>	Hrvatska	Umag	09/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AI43	<i>Merodon avidus</i>	Grčka	Mount Olympus	28/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AI44	<i>Merodon avidus</i>	Grčka	Mount Olympus	28/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AI45	<i>Merodon avidus</i>	Grčka	Mount Olympus	28/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AI46	<i>Merodon avidus</i>	Grčka	Mount Olympus	28/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AI47	<i>Merodon avidus</i>	Grčka	Mount Olympus	28/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AI8	<i>Merodon avidus</i>	Grčka	Evros	09/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AI9	<i>Merodon avidus</i>	Grčka	Evros	09/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AI10	<i>Merodon avidus</i>	Grčka	Evros	09/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AI11	<i>Merodon avidus</i>	Grčka	Evros	09/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AI12	<i>Merodon avidus</i>	Grčka	Evros	09/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AH97	<i>Merodon avidus</i>	Turska	Beşparmak Mountains	20/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AH98	<i>Merodon avidus</i>	Turska	Beşparmak Mountains	20/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AH99	<i>Merodon avidus</i>	Turska	Beşparmak Mountains	20/09/2013	Vujić A.	Vujić A.

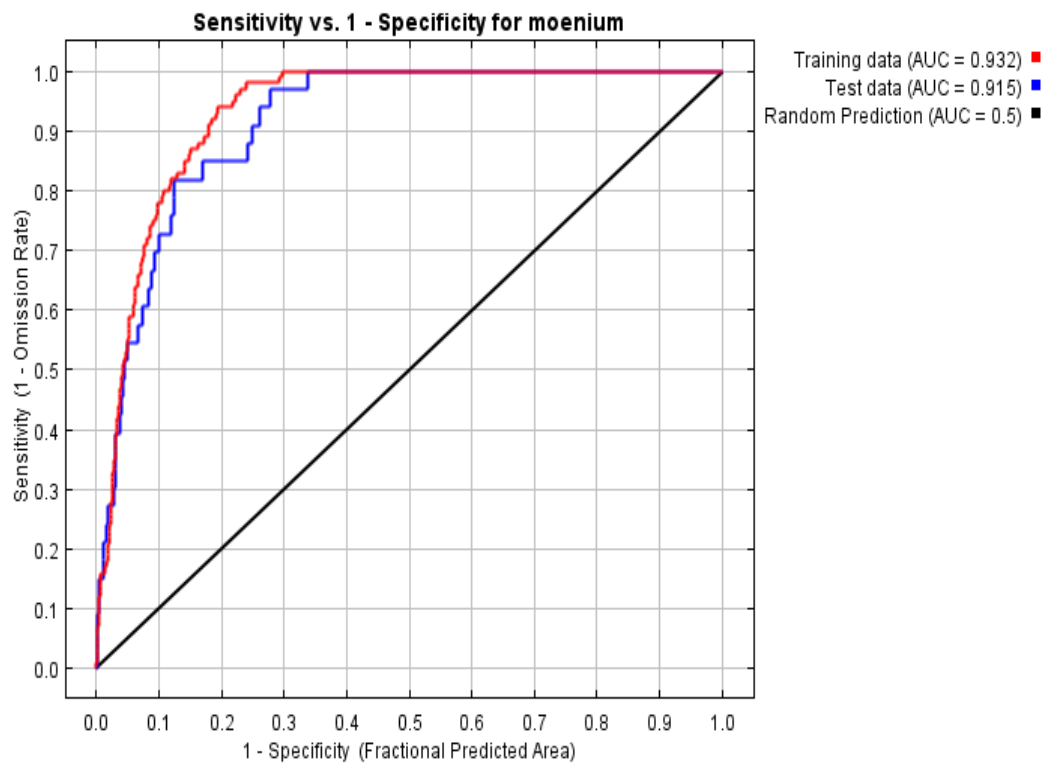
AI1	<i>Merodon avidus</i>	Turska	Beşparmak Mountains	20/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AI2	<i>Merodon avidus</i>	Turska	Beşparmak Mountains	20/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AH76	<i>Merodon avidus</i>	Turska	Bozdağ Mountains	18/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AH77	<i>Merodon avidus</i>	Turska	Bozdağ Mountains	18/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AH78	<i>Merodon avidus</i>	Turska	Bozdağ Mountains	18/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AH79	<i>Merodon avidus</i>	Turska	Bozdağ Mountains	18/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AH80	<i>Merodon avidus</i>	Turska	Bozdağ Mountains	18/09/2013	Vujić A.	Vujić A.
AI5	<i>Merodon avidus</i>	Turska	Bozdağ Mountains	18/09/2013	Vujić A.	Vujić A.

Tabela 5. Lista uzoraka korišćenih za modelovanje distribucije vrsta *M. avidus* kompleksa

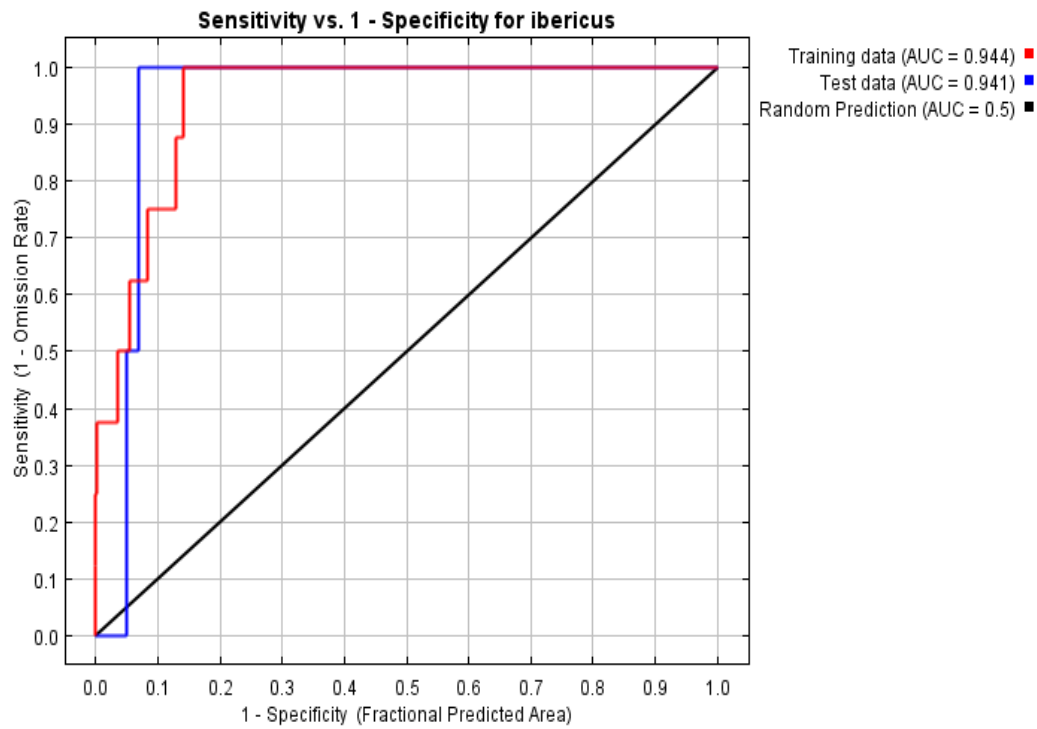
vrsta	država	broj jedinki
<i>Merodon avidus</i>	Albanija	1
	Bosna i Hercegovina	2
	Bugarska	10
	Crna Gora	108
	Francuska	146
	Grčka	422
	Hrvatska	55
	Italija	185
	Izrael	2
	Kipar	10
	Makedonija	52
	Srbija	182
	Turska	8
<i>Merodon ibericus</i>	Maroko	22
	Španija	26
<i>Merodon megavidus</i>	Grčka	52
<i>Merodon moenium</i>	Andora	1
	Bosna i Hercegovina	2
	Crna Gora	115
	Danska	4
	Francuska	77
	Grčka	29

<i>Merodon moenium</i>	Holandija	1
	Hrvatska	24
	Italija	99
	Makedonija	18
Merodon moenium	Nemačka	5
	Rumunija	3
	Slovačka	7
	Slovenija	2
	Srbija	443
	Švajcarska	25
	Švedska	4
Ukupno		2135

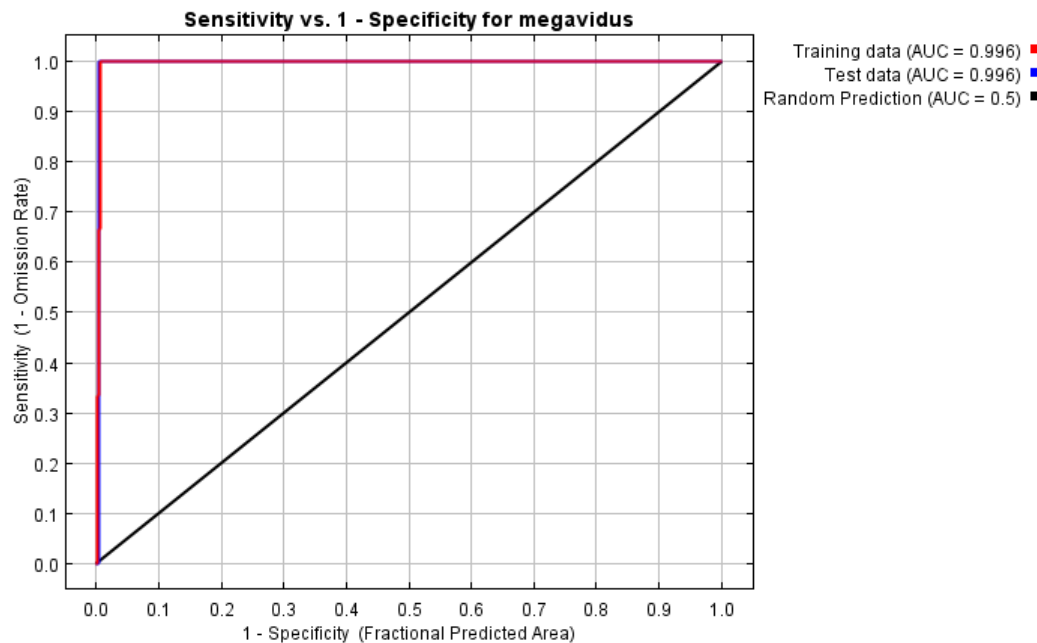
a)



b)

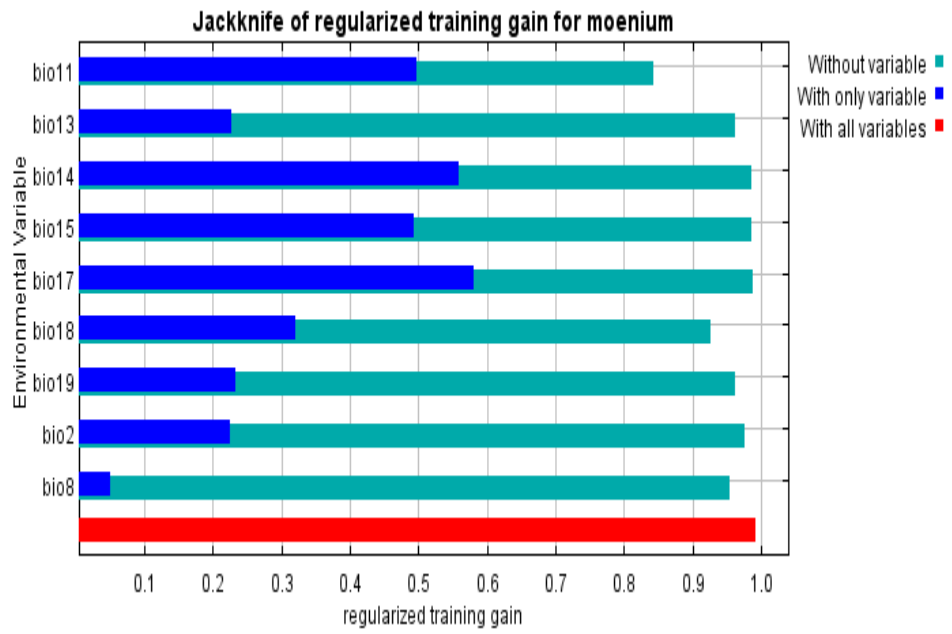


c)

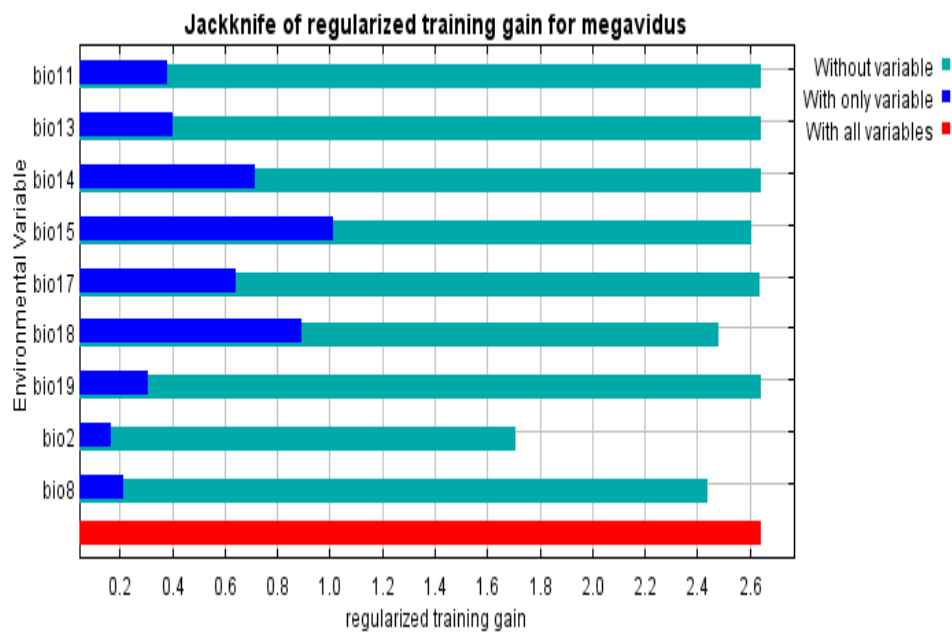


Slika 4. ROC grafik za taksone *M. moenium* (a), *M.ibericus* (b) i *M. megavidus* (c) i AUC vrednosti dobijene na osnovu trening i test podataka u Maxent-u.

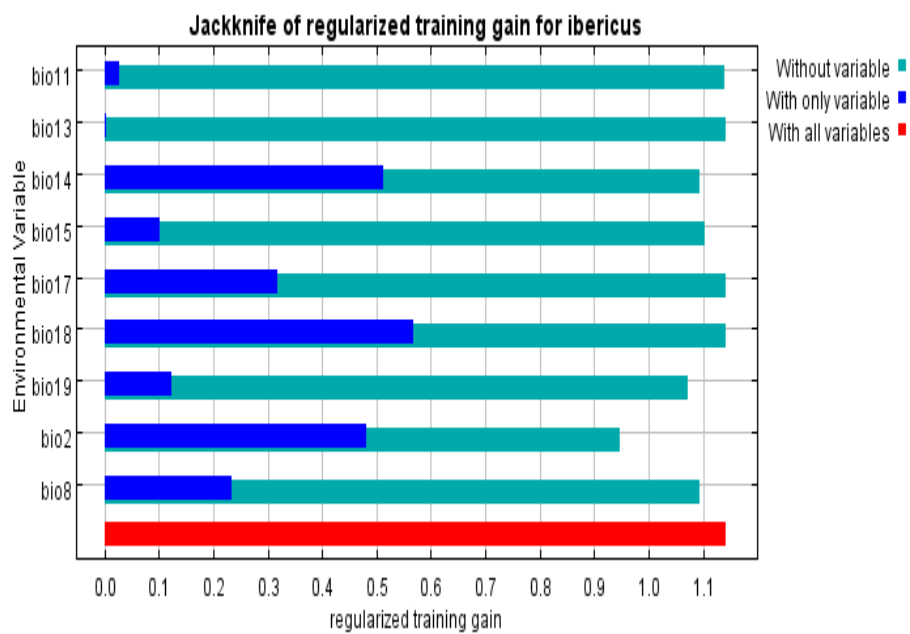
a)



b)



c)



Slika 5. Grafički prikaz važnosti pojedinačnih varijabli u Maxent analizi vrste *M. moenium* (a), *M. megavidus* (b) i *M. ibericus* (c), dobijen jackknife testom

```

library(neuralnet), library(ggplot2), library(nnet),
library(dplyr), library(reshape2)

set.seed(123)

##predikcija na osnovu vremenskih podataka #####

#ocscenji podaci

baza <- slice(baza_nn_clean_date, 1:500)

# ili predikcija nedostajucih podataka

baza <- slice(baza_nn_mice_date, 1:500)

baza <- baza[, c(2, 3, 4,5, 1)]

labels <- class.ind(as.factor(baza$Species))

standardiser <- function(x){ (x-min(x))/(max(x)-min(x))}

baza[, 1:4] <- lapply(baza[, 1:4], standardiser)

pre_process_baza <- cbind(baza[,1:4], labels)

f <- as.formula("avidus + moenium ~ Sex + Day + Month + Year")

baza <- neuralnet(f, data = pre_process_iris, hidden=10 , act.fct = "tanh",
linear.output = FALSE,stepmax=1e6) #("Model Accuracy: ")

plot(baza)

baza_preds <- neuralnet::compute(baza, pre_process_baza[, 1:4])

origi_vals <- max.col(pre_process_baza[, 5:6])

pr.nn_2 <- max.col(baza_preds$net.result)

print(paste("Model Accuracy: ", round(mean(pr.nn_2==origi_vals)*100, 2),
"%.", sep = ""))

#graficki prikaz

install.packages("ggvis"), library(ggvis)

baza %>% ggvis(~Month, ~Year, fill = ~factor(Species)) %>% layer_points()

```

```

##predikcija na osnovu geografskih podataka #####
#ocisceni podaci
baza <- slice(baza_nn_clean_geo, 1:500)
# ili predikcija nedostajucih podataka
baza <- slice(baza_nn_mice_geo, 1:500)
baza <- baza[, c(2, 3, 4, 1)]
labels <- class.ind(as.factor(baza$Species))
standardiser <- function(x){
  (x-min(x))/(max(x)-min(x))
}
baza[, 1:3] <- lapply(baza[, 1:3], standardiser)
pre_process_baza <- cbind(baza[,1:3], labels)
f <- as.formula("avidus + moenium ~
                Sex + Latitude + Longitude")
baza_net <- neuralnet(f, data = pre_process_baza, act.fct = "tanh", linear.output =
FALSE)
plot(baza_net)
baza_preds <- neuralnet::compute(baza_net, pre_process_baza[, 1:3])
origi_vals <- max.col(pre_process_baza[, 4:5])
pr.nn_2 <- max.col(baza_preds$net.result)
print(paste("Model Accuracy: ",
            round(mean(pr.nn_2==origi_vals)*100, 2), "%.", sep = ""))
#graficki prikaz
install.packages("ggvis")
library(ggvis)
baza_nn_clean_geo %>% ggvis(~Latitude, ~Longitude, fill = ~factor(Species))
%>% layer_points()

```

Slika 6. Deo koda korišćenog u programiranju modela za određivanje taksonomske pripadnosti jedinki uz pomoć neuronske mreže

```

# model 1 - model_data <- baza_final_adjusted
# model 2 - model_data <- baza_mice
# model 3 - model_data <- baza_clean
names(model_data)[names(model_data) == 'Species group'] <-
SpeciesGroup'
names(model_data)[names(model_data) == 'Species complex'] <-
'SpeciesComplex'
names(model_data)[names(model_data) == 'Geographical Region']
<- 'GeographicalRegion'
model_data <- na.omit(model_data)for(i in model_data){
model_data$Species <- ifelse(model_data$Species=="avidus", 1,
model_data$Species) }for(i in model_data){
model_data$Species <- ifelse(model_data$Species==1, 1, 0) }
set.seed(1234)
v_indices <- sample(seq_len(nrow(model_data)), size =
0,8*nrow(model_data))
train <- model_data[v_indices,]
test <- model_data[-v_indices,]
randomSeed = 1337;set.seed(randomSeed);library(gbm)
LogLossBinary = function(actual, predicted, eps = 1e-15) {
predicted = pmin(pmax(predicted, eps), 1-eps)
- (sum(actual * log(predicted) + (1 - actual) * log(1 -
predicted))) / length(actual) }
train$Month <- as.factor(train$Month)
train$Sex <- as.factor(train$Sex)
#region needs to be deleted after work with the row data
train$GeographicalRegion <- as.factor(train$GeographicalRegion)
train$Country <- as.factor(train$Country)
train$Date <- as.factor(train$Date)
train$Year <- as.factor(train$Year)
train$Latitude <- as.factor(train$Latitude)
train$Longitude <- as.factor(train$Longitude)
gbmModel = gbm(formula = Species ~ Sex + Date + Month + Year,
distribution = "bernoulli", data = train, n.trees = 2500,
shrinkage = .01, n.minobsinnode = 20)
gbmTrainPredictions = predict(object = gbmModel,
newdata = test, n.trees = 150, type = "response")
head(data.frame("Actual" = test$Species,
"PredictedProbability" = gbmTrainPredictions))
LogLossBinary(train$Species, gbmTrainPredictions)
gbmModel = gbm(formula = Species ~ Sex + Latitude + Longitude,
distribution = "bernoulli",data = train, n.trees = 2500,
shrinkage = .01, n.minobsinnode = 20)
gbmTrainPredictions = predict(object = gbmModel,
newdata = test, n.trees = 150, type = "response")
head(data.frame("Actual" = test$Species,
"PredictedProbability" = gbmTrainPredictions))
LogLossBinary(train$Species, gbmTrainPredictions)

```

Slika 7. Deo koda korišćenog u programiranju modela za određivanje taksonomske pripadnosti jedinki GBM metodom regresionih stabala

BIOGRAFIJA



Dunja Popović (rođ. Petrović) je rođena 17. maja 1986. godine u Novom Sadu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, smer diplomirani biolog-molekularni biolog je upisala 2005. godine. Fakultet je završila 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,53. Tokom studija je bila stipendista Ministarstva prosvete i sporta i dobitnica više fakultetskih nagrada.

Nakon završetka redovnih studija, 2009. godine upisuje Master akademske studije, modul Master biolog, na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Ovaj stepen studija završava 2011. godine, sa prosečnom ocenom 9,60.

Doktorske studije, studijski program Doktor bioloških nauka, na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, upisuje 2011. godine. U februaru 2011. godine birana je u zvanje istraživača-pripravnika za užu naučnu oblast Genetika, u okviru angažmana na projektu finansiranom od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije: „Konzervaciona strategija za očuvanje zaštićenih i strogo zaštićenih vrsta u Srbiji-osolike muve (Diptera: Syrphidae) kao model organizmi“, pod rukovodstvom prof. dr Ante Vujića. U decembru 2013. godine birana je u zvanje istraživača saradnika za istu naučnu oblast. U periodu od 2011. do 2014. godine bila je učesnik i na dva kratkoročna projekta od značaja za nauku i održivi razvoj AP Vojvodina, pod rukovodstvom prof. dr Ante Vujića i dr. Gordane Bogdanović.

Oblast naučne delatnosti je Genetika-proučavanje genetičke varijabilnosti populacije biljnih i životinjskih vrsta upotrebom molekularnih markera. Koautor je 4 rada u međunarodnim časopisima, 1 rada u časopisu od nacionalnog značaja, 2 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u celini, 2 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu i 3 saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampanih u izvodu.

Udata je i ima sina Andreja i ćerku Emu. Govori nemački i engleski jezik.



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO–MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorat
Ime i prezime autora: AU	Dunja Popović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	doc.dr Nevena Veličkovć, docent
Naslov rada: NR	Genetička karakterizacija kompleksa <i>Merodon avidus</i> (Diptea: Syrphidae)
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)

Jezik izvoda:	srp. / eng.
JI	
Zemlja publikovanja:	Republika Srbija
ZP	
Uže geografsko područje:	Vojvodina
UGP	
Godina:	2019
GO	
Izdavač:	autorski reprint
IZ	
Mesto i adresa:	Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad
MA	
Fizički opis rada:	10 poglavlja / 174 stranica / 30 slika/22 tabele/226 literaturnih navoda / 1 prilog
FO	
Naučna oblast:	Biologija
NO	
Naučna disciplina:	Genetika
ND	
Predmetna odrednica, ključne reči:	mtDNK, alozimi, gentička struktura, kriptčne vrste, veštačka inteligencija, osolike muve
PO	
UDK	
Čuva se:	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno–matematičkog fakulteta u Novom Sadu
ČU	
Važna napomena:	
VN	

Izvod:

IZ

U radu je izvršen integrativno-taksonomski pristup analize kompleksa vrsta *Merodon avidus* (Diptera: Syrphidae), na geografski i vemenski obimnom materijalu. U okviru genetičke karakterizacije kriptičnih vrsta navedenog kompleksa, bazirane na 3' i 5' fragmentima mitohondrijalnog COI gena, određeni su parametri genetičke varijabilnosti i utvrđeni jedinstveni i deljeni haplotipovi u okviru i između pretpostavljenih vrsta. Rezultati genetičke varijabilnosti COI DNK sekvenci pokazali su da jedinke sa ostrva Krf i Evia i poluostrva Peloponez, preliminarno identifikovane kao *M. moenium*, predstavljaju novu, endemsku vrstu proučavanog kompleksa. Dijagnostički enzimski lokusi pokazali su da *M. avidus* i *M. moenium* predstavljaju sestrinske vrste, koje su se, u okviru kompleksa vrsta *M. avidus*, poslednje razdvojile. Zaključeno je da se kompleks vrsta *M. avidus* sastoji od 5 vrsta: *M. avidus*, *M. moenium*, *M. megavidus*, *M. ibericus* i *M. aff. moenium*. U nastavku, oslanjajući se na moderne tehnike veštačke inteligencije, izvršeno je modelovanje distribucije vrsta i poređenje sličnosti utvrđenih ekoloških niša. U poslednjem segmentu istraživanja, prednosti veštačke inteligencije iskorišćene su u modelovanju sistema za determinaciju jedinki sestrinskih vrsta u uzorku, na osnovu adekvatne varijable. Ovo istraživanje doprinelo je karakterizaciji biodiverziteta osolikih muva, rasvetljavanju taksonomskog statusa vrsta i kreiranju smernica za definisanje budućih konzervacionih programa zaštite biodiverziteta vrsta *Merodon avidus* kompleksa.

Datum prihvatanja teme od strane Senata:

21.06.2018.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status)

KO

Predsednik:

dr Ante Vujić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Član

dr Nevena Veličković, docent, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom

Član

dr Nataša Kočiš Tubić, naučni saradnik, Prirodno matematički-fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Član

dr Jelena Ačanski, naučni saradnik, Institut BioSens, Univerzitet u Novom Sadu

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OF SCIENCES



KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	
Author: AU	Dunja Popović
Mentor: MN	Doc.dr Nevena Veličković
Title: TI	Genetic characterisation of <i>Merodon avidus</i> species complex (Diptera: Syrphidae)
Language of text:	Serbian (latin)

LT	
Language of abstract:	eng. / srp.
LA	
Country of publication:	Republic of Serbia
CP	
Locality of publication:	Vojvodina
LP	
Publication year:	2019
PY	
Publisher:	Author's reprint
PU	
Publication place:	Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad
PP	
Physical description:	10 chapters / 174 pages / 30 figures and graphs / 22 Tables/ 226 literature items/ 1 supplement
PD	
Scientific field	Biology
SF	
Scientific discipline	Genetics
SD	
Subject, Key words	mtDNA, allozymes, genetic structure, cryptic species, artificial intelligence, hoverflies
SKW	
UC	
Holding data:	Library of Department of Biology and ecology, Novi Sad
HD	

Note: N	
Abstract: AB	<p>During this research, an integrative-taxonomic analysis of <i>M. avidus</i> species complex was performed. The study was based on geographically and temporally extensive material. Genetic characterisation of cryptic species, based on 5' and 3' regions of COI gene, defined parameters of genetic variability. Shared and unique haplotypes between and within of cryptic species were detected. The results of genetic variability analysis based on COI gene showed that specimens from the islands Corfu, Evia and half-island Peloponnese, which were preliminarily identified as <i>M. moenium</i>, represent a new, endemic species of the selected complex. Diagnostic enzyme loci showed that <i>M. avidus</i> and <i>M. moenium</i> represent sibling species, which were the last one who separated within <i>M. avidus</i> complex. According to current information, it was concluded that <i>M. avidus</i> complex consists of 5 species: <i>M. avidus</i>, <i>M. moenium</i>, <i>M. megavidus</i>, <i>M. ibericus</i> and <i>M. aff. moenium</i>. In the next chapter, relying on modern techniques of artificial intelligence, the species distribution modelling and the comparison of ecological niches were performed. In the last part of the research, the advantages of artificial intelligence were used in order to model a system that was able to determinate one of two sibling species, based on appropriate predictor. This research has generally contributed to a characterization of hoverfly diversity and helped resolving a taxonomic status of species in one of the most challenging groups in Syrphidae family. Genetic differentiation data represent directions for defining future conservation strategies for biodiversity protection of defined cryptic species of <i>Merodon avidus</i> complex</p>

Accepted on Senate on: AS	21.6.2018.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	
President:	dr Ante Vujić, Full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Member:	dr Nevena Veličković, Assistant professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Member:	dr Nataša Kočiš Tubić, Research Associate, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Member:	dr Jelena Ačanski, Research Associate, BioSens Institute, University of Novi Sad