

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena A. Đuknić

**DIVERZITET I GENETIČKA VARIJABILNOST
FAMILIJE SIMULIIDAE (INSECTA: DIPTERA)
NA PODRUČJU BALKANSKOG
POLUOSTRVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Jelena A. Đuknić

**DIVERSITY AND GENETIC VARIABILITY
OF THE SIMULIIDAE FAMILY (INSECTA:
DIPTERA) IN THE AREA OF THE BALKAN
PENINSULA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023.

Mentori:

dr Ivana Živić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu — Biološki fakultet

dr Nataša Popović, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu — Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković" —
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Članovi komisije:

dr Katarina Stojanović, docent
Univerzitet u Beogradu — Biološki fakultet

dr Vladimir Jovanović, Research assistant
Human biology and primate evolution, Department of Biology, Chemistry, Pharmacy,
Freie Universität Berlin (Berlin, Germany)

dr Nikola Marinković, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu — Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković" —
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Prvenstveno želim da se zahvalim mojim mentorima prof. dr Ivani Živić i dr Nataši Popović na svim savetima, ukazanom poverenju, podršci i slobodi da na svoj način sagledam i obradim temu. Ivana, hvala Vam što ste bili dosledni i pravični, i što sam na vašu inicijativu ispoštovala sve rokove tokom studija. Nale, hvala ti na svemu. Što si mi bila vetar u leđa kad mi je to bilo potrebno, što si me slušala, terala me kada mi se nije radilo, sedela samnom danima kako bismo nešto dovele do željenog, a sve to lako bez opterećenja i tenzije. Bilo je uživanje!

Veliku zahvalnost dugujem i članovima komisije, dr Vladimiru Jovanoviću, dr Katarini Stojanović i dr Nikoli Marinkoviću koji su svojim sugestijama doprineli da ova disertacija poprimi svoju konačnu formu. Vlado tebi dugujem najveću zahvalnost, što si bio moja zvezda vodilja i večita inspiracija od starta pa do samog kraja. Hvala ti na bezuslovnoj pomoći, svakoj konstruktivnoj diskusiji i vremenu koje si mi nesebično posvetio. Da nije bilo tebe, ne bi bilo ni ove teze, bar ne u ovoj formi. Znaš da si samo jedan. Kale hvala što si me uvukla u svet hidroekologije i makrobeskičmenjaka, što si bila tu kada sam počinjala i svojim optimizmom sve činila zabavnim. Nidžo hvala na pomoći oko statističkih analiza, saveta i sugestija tokom pisanja teze.

Zahvaljujem se i kolegama sa Odeljenja za hidroekologiju i zaštitu voda na podršci, želji da se nađu kada je to potrebno, da podele samnom svu tremu, anksioznost i paniku pred kraj pisanja disertacije. Majo, Naco, Boko, Jeco, Boška, Maro, Čanki, Stefke, Nidžo, Kajo, Ana, Điki, Magi, Stoimire, Kaća i Jovana hvala! Posebno hvala dr Momiru Paunoviću na prenešenom znanju i skustvu. Momo, hvala što si verovao u mene i stvorio uslove da se odrade terenska istraživanja po čitavom Balkanu. Kolegama i prijateljima dr Stefanu Anđusu i dr Jeleni Čanak Atlagić hvala na razgovorima i podršci. Jeco, sapatnice, hvala na svemu. Tvoja iskrenost i saveti su mi beskrajno značili.

Veliko hvala Maji Novković koja je imala strpljenja da sa mnom radi u Gisu. Majo, hvala što si putovala sa mnom po mapama Balkana, i što si delila sa mnom sav moj optimizam i pesimizam.

Ova teza ne bi bila moguća bez podrške kolega iz okolnih zemalja. Da nije bilo vaše pomoći bilo bi nemoguće prikupiti uzorke. Hvala Predragu Mitroviću iz Instituta za vode iz Bijeljine RS sa kojim sam išla po terenima u Bosni i Hercegovini, kao i Nataši Crnković iz Centra za zaštitu životne sredine, zahvaljujući kojoj sam prikupila uzorke sa Sutjeske, Sane i Neretve. Hvala prof. dr Dubravki Čerbi sa Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera iz Osijeka, na pomoći oko terena realizovanih u Hrvatskoj, prof. dr Valentina Slavevska-Stamenković sa Prirodno-matematičkog Fakulteta iz Skoplja na pomoći oko terena realizovanih u Severnoj Makedoniji, dr Svetoslav Cheshmedjiev na pomoći oko terena realizovanih u Bugarskoj, dr Nikolaosu Skoulikidisu sa Institute of Marine Biological Resources and Inland Waters, Hellenic Centre for Marine Research na pomoći oko terena realizovanih u Grčkoj. Poseno hvala dr Béla Csányi iz Hungarian Academy of Sciences, Center for Ecological Research, Danube Research Institute, koji je prikupio materijal iz Albanije i dr Yannis Karaouzas sa Institute of Marine Biological Resources and Inland Waters, Hellenic Centre for Marine Research koji je prikupio deo materijala iz Grčke. Béla, thank you for the simulides from Albania. Yannis, thanks for selflessly shared with me simulid samples from Greece and remembering me in my time of need. Kolegama dr Maji Raković, Momi i Nikoli hvala na uzorcima iz Crne Gore. Na uzorcima iz Srbije hvala svim kolegama sa odeljenja koji su me se setili i odvojili malo vremena na terenu pa prikupe i dopune materijal za ovu tezu.

Posebno hvala prof. dr Aleksandri Ignjatović Čupini sa Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, i dr Mariji Ivković sa Biološkog odsjeka matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na literaturi i savetima vezanim za simulide.

Hvala kolegama dr Tatiana Kúdelová i dr Matúš Kúdela sa odeljenja za zoologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta Komenského u Bratislavi na savetima oko identifikacije i proveru identifikovanog materijala. Tatiana and Matúš, thank you for your advicese and guidance regarding identification of Simuliidae larvae and pupae.

Ogromno hvala dugujem svojim roditeljima i sestri koji su me bodrili, sa mnom plakali i radovali se, bili strpljivi i entuzijastični. Hvala vam što ste samnom proživeli ovu disertaciju u svakom smislu, išli po terenima, sakupljali simulide, čekali me i čuvali decu. Hvala što ste mi poklonili vreme i energiju. Naučili ste me odgovornosti i upornosti.

I naravno, neizmerno hvala mojoj porodici Miši, Strahinji i Seni na ljubavi, strpljenju i podršci. Mišo hvala što si tu za mene i što veruješ u mene čak i kada ja sumnjam. Ovu disertaciju posvećujem vama.

Jelena Đuknić

Diverzitet i genetička varijabilnost familije Simuliidae (Insecta: Diptera) na području Balkanskog poluostrva

Sažetak

Na području Balkanskog poluostrva, u periodu od 2013-2021. godine identifikovano je 46 taksona simulida (larvi i lutaka) sa 256 lokaliteta. Dominantna vrsta bila je *Simulium ornatum*, a pratile su je *S. reptans*, *S. variegatum* i *S. balcanicum*. Vrsta *S. turgaicum* je prvi put zabeležena na Balkanskom poluostrvu. Većina zabeleženih vrsta se pokazala eurivalentna u odnosu na nadmorsku visinu i tip vodotoka. *Prosimulium hirtipes* je karakterističan za male, brze vodotokove, dok je *S. brevidens* je krenobiont vezan za nadmorske visine preko 800 m. Najveći diverzitet simulida zabeležen je u malim i srednjim vodotocima na nadmorskim visinama 500–800 m. Sve ispitivane grupe zajednica simulida karakterisao je visok *beta* diverzitet. Genetičkim analizama (mtCOI gena) podroda *Wilhelmia*, koji je bio predstavljen sa 7 vrsta, otkriveno je prisustvo 15 monofiletskih klada (potencijalnih vrsta). U okviru podroda *Wilhelmia* izdvojene su dve monofiletske grane: *equinum* granu čine morfo-vrste *S. equinum* i *S. pseudequinum*, dok *lineatum* granu čine *S. sergenti*, *S. paraequinum*, *S. lineatum*, *S. turgaicum* i *S. balcanicum*. Razdvajanje klada morfo-vrste *S. pseudequinum* desilo se u oligocenu, najverovatnije alopatričkom specijacijom. Pretpostavljamo da je klada *S. pseudequinum* B endemit Balkanskog poluostrva. U okviru *lineatum* linije, sestrinske vrste *S. lineatum*, *S. turgaicum* i *S. balcanicum* bile su prisutne sa po dve klade. Filogenetske analize vrsta *S. reptans* i *S. reptantoides* pokazale su prisustvo dve forme (A i B) kod svake od njih. Distribucija *S. reptans* A ograničena je na zapadnu i severnu Evropu, dok je *S. reptans* B zabeležen na Balkanu. Obe forme *S. reptantoides* prisutne su na Balkanu, koji ujedno može da predstavlja i mesto porekla A forme.

Ključne reči: Simuliidae, Balkansko poluostrvo, diverzitet, genetička varijabilnost, filogenija, COI, *Wilhelmia*, *Simulium reptans*, *Simulium reptantoides*.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Entomologija

Diversity and genetic variability of the Simuliidae family (Insecta: Diptera) in the area of the Balkan Peninsula

Abstract

During period from 2013 to 2021 from 256 localities at the Balkan Peninsula, 46 simuliids taxa (larvae and pupae) were identified. The dominant species was *Simulium ornatum*, followed by *S. reptans*, *S. variegatum* and *S. balcanicum*. Presence of *Simulium turgaicum* in the Balkan Peninsula was recorded for the first time. Most of the recorded species were euryvalent with respect to elevation and water body type. *Prosimulium hirtipes* was characteristic for small rivers, while *S. brevidens* was a crenobiont found at elevations above 800 m. The greatest diversity of simuliids was found in small and medium water bodies at elevations of 500-800 m. High beta diversity characterized all studied groups of simulid communities. Genetic analyses (mtCOI gene) of the subgenus *Wilhelmia*, whereby it was represented by 7 species, revealed the presence of 15 monophyletic clades (potential species). Within the subgenus *Wilhelmia*, two monophyletic branches can be distinguished: the *equinum* branch consists of the morphospecies *S. equinum* and *S. pseudequinum*, while the *lineatum* branch consists of *S. sergenti*, *S. paraequinum*, *S. lineatum*, *S. turgaicum*, and *S. balcanicum*. Within morphospecies *S. pseudequinum* clades diversification occurred in the Oligocene, most likely by allopatric speciation. We assume that the clade *S. pseudequinum* B is endemic to the Balkan Peninsula. Within the *lineatum* line, the sister species *S. lineatum*, *S. turgaicum*, and *S. balcanicum* were represented by two clades each. Phylogenetic analyzes of the species *S. reptans* and *S. reptantoides* revealed the presence of two forms (A and B) in each of them. The distribution of *S. reptans* A is restricted to western and northern Europe, while *S. reptans* B has been found in the Balkans. Both forms of *S. reptantoides* occur in the Balkans, which could also be the place of origin of the form A.

Key words: Simuliidae, Balkan Peninsula, diversity, genetic variability, phylogeny, COI, *Wilhelmia*, *Simulium reptans*, *Simulium reptantoides*.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Entomology

Sadržaj

UVOD

1.1. Opšte odlike familije Simuliidae	1
1.2. Životni ciklus	1
1.2.1. Morfološke odlike larvi simulida	2
1.2.2. Morfološke odlike lutaka simulida	4
1.3. Ekologija	5
1.4. Sistematika i taksonomija	7
1.5. Distribucija	8
1.6. Filogenija	8
1.7. Pregled istraživanja familije Simuliidae na Balkanu	9

CILJEVI

MATERIJAL I METODE

3.1. Opis istraživanih lokaliteta i karakteristike staništa	16
3.2. Prikupljanje i obrada uzoraka	20
3.3. Molekularne analize	21
3.3.1. Izolacija DNK, amplifikacija lančanom reakcijom polimeraze (PCR) i sekvenciranje	21
3.3.2. Genetička analiza	25
3.4. Statističke analize	27
3.4.1. Analiza distribucije najčešćih vrsta simulida i njihova ekološka diferencijacija	27
3.4.2. Analize zajednica simulida u različitim tipovima staništa	28
3.4.3. Analize biološkog diverziteta simulida u različitim tipovima staništa	28

REZULTATI

4.1. Tipološka analiza ispitivanog područja	31
4.2. Faunistički sastav familije Simuliidae na ispitivanom području	31

4.3.	Genetičke analize i filogenetski odnosi vrsta simulida.....	36
4.3.1.	Genetička varijabilnost i filogenetski odnosi podroda <i>Wilhelmia</i>	36
4.3.2.	Genetička varijabilnost i filogenetski odnosi vrsta <i>S. reptans</i> i <i>S. reptantoides</i>	42
4.4.	Analiza distribucije simulida u različitim tipovima staništa.....	46
4.5.	Ekološka diferencijacija simulida.....	50
4.5.1.	Ekološka diferencijacija najčešćih vrsta simulida.....	50
4.5.2.	Ekološka diferencijacija najčešćih grupa taksona simulida.....	52
4.6.	Zajednica simulida u različitim tipovima staništa	53
4.7.	Diverzitet simulida u različitim tipovima staništa	57
4.7.1.	Analiza alfa diverziteta zajednica simulida	57
4.7.2.	Analiza beta diverziteta zajednica simulida.....	59

DISKUSIJA

5.1.	Genetička varijabilnost vrsta podroda <i>Wilhelmia</i>	64
5.1.1.	<i>Equinum</i> grana	64
5.1.2.	<i>Lineatum</i> grana.....	65
5.2.	Genetička varijabilnost vrsta <i>Simulium reptans</i> i <i>S. reptantoides</i>	67
5.3.	Distribucija simulida na Balkanu i njihove ekološke preference	68
5.4.	Diverzitet simulida na Balkanskom poluostrvu.....	71
5.4.1.	Biodiverzitet vrsta podroda <i>Wilhelmia</i> na Balkanskom poluostrvu	71
5.4.2.	Biodiverzitet vrsta <i>S. reptans</i> i <i>S. reptantoides</i> na Balkanskom poluostrvu.....	72

ZAKLJUČCI

LITERATURA

PRILOZI

UVOD

1.1. Opšte odlike familije Simuliidae

Simuliidae (simulide) su familija insekata iz reda Diptera (dvokrilci), podreda Nematocera (niži dvokrilci). Predstavljaju grupu organizama koji povezuju dve značajno različite sredine, akvatične i terestične ekosisteme. Zbog svoje biologije, ekologije, uloge u ekosistemu i uticaja koji imaju na druge organizme uključujući ljude, često su objekt kontadiktornih stavova. Tako se njihove akvatične forme smatraju korisnim, jer su značajna komponenta u lancima ishrane i prečišćavanju akvatičnih ekosistema, dok se terestične forme smatraju štetočinama, s obzirom da se ženke hrane krvlju drugih životinja (Adler i sar., 2004).

Familija Simuliidae je široko rasprostranjena a njene vrste se mogu naći u svim tipovima tekućih voda, od izvorišnih regiona, preko malih brdsko-planinskih potoka do velikih ravničarskih reka. Smatraju se kosmopolitima jer naseljavaju sve kontinente, izuzev Antarktiku (Rivosecchi, 1978), krečnjačkih ostrva bez tekućih voda, kao i koralnih ostrva Tihog i Indijskog okeana (Adler, 2022).

1.2. Životni ciklus

Simulide spadaju u holometabolne insekte koji tokom svog životnog ciklusa prolaze kroz četiri razvojna stadijuma: jaje, larva, lutka i adult. Razviće jaja, larvi i lutaka se odvija u akvatičnim ekosistemima, dok se razviće adulata i razmnožavanje odvijaju u terestričnim ekosistemima. Životni vek adulta obično traje 10 – 35 dana, mada ženke žive duže od mužjaka (Crosskey, 1990).

Nakon parenja, ženke polažu jaja u blizini akvatičnih ekosistema. Neke vrste u letu ispuštaju jaja iznad površine vode, nakon čega ona padaju na dno. Druge polažu jaja uz obalu i to u zonama sa razvijenom vegetacijom. Jaja su obložena želatinoznom omotačem koji u kontaktu sa vodom bubri, postaje teži i tone. Najčešće se jaja omotačem zalepe ili pričvrste za raznovrsne supstrate ispod površine vode, kao što su submerzni delovi vegetacije, kamenje, granje i drugo (Adler i sar., 2004). Nekada su jaja pričvršćena i za flotantne supstrate koji su u stalnom kontaktu sa vodom. Jaja su manje ili više ovalna, asimetrična, dužine od 0,1 mm do 0,4 mm. Horion je gladak, a boja jaja se menja kroz različite faze njihovog razvoja. U početku su svetlo žute boje, a kako sazrevaju postepeno tamne, poprimajući tamno braon ili čak crnu boju. Broj jaja varira od 30 do 800 zavisno od vrste (Crosskey, 1990). Ženke najvećeg broja vrsta polažu više stotina jaja (od 150 do 600) (Davies i Peterson, 1957; Adbelnur, 1968; Pascuzzo, 1976). Lučenje hormona prilikom polaganja jaja stimuliše druge ženke da polože jaja u neposrednoj blizini.

Nakon nekoliko dana iz jaja se razvijaju larve. Broj larvenih stupnjeva uglavnom se kreće od 5 do 11 i umnogome zavisi od temperature vode. U akvatičnim sredinama, koje odlikuje viša temperatura vode i koje su bogate hranom, broj larvenih stupnjeva je manji (Adler i sar., 2004). Larva poslednjeg stupnja ispreda kokon u kome će se formirati lutka.

Kokon je zakačen za različite supstrate u vodi, orijentisan tako da se njegov širi deo nalazi nizvodno, što smanjuje otpor vode. Kada dođe vreme emergencije, adult stvara pritisak na košuljicu, ona puca u obliku slova T i adult napušta košuljicu.

Adulti simulida su krilati insekti, dužine tela od 1,5 mm do 6 mm, obično tamne boje. Karakteriše ih povijeno telo i jedan par širokih membranoznih krila. Ženke su obično svetlije od mužjaka, imaju uži i nešto ravniji toraks, sitnije najčešće tamne oči i širok abdomen. Adultne jedinke su veoma pokretne, mogu da prelete više od 500 km (Crosskey, 1990) i uspešno kolonizuju čak i udaljena ostrva (Craig i sar., 2001).

1.2.1. Morfološke odlike larvi simulida

Telo larvi simulida čine od tri regiona: glava, toraks i abdomen. Glava je dobro razvijena, sklerotizovana. Telo je duguljasto, ovalno, blago savijeno i u zadnjem delu prošireno. Larve odlikuje slabo izražena segmentacija i odsustvo nogu (apodne su). Na protoraksu sa ventralne strane nalazi se lažna nožica (pseudopodija) sa prstenasto raspoređenim kukicama u više nizova, dok je na posteriornom delu abdomena adhezivni disk, sačinjen od većeg broja kukica (Slika 1). Pomoću njega larva se zakači za supstrat, dok se po supstratu kreće naizmeničnim kačenjem i otpuštanjem ove dve strukture. U slučaju jakih vodenih struja, dodatno pričvršćivanje za podlogu omogućava mreža svilenih niti koja služi kao lepak, a luče je larve pomoću svojih pljuvačnih žlezda (Ignjatović Čupina, 2011).

U zavisnosti od vrste, dužina larve u poslednjem stupnju varira i kreće se od 3 mm do 15 mm. Ovaj stupanj karakteriše se tamnim histoblastima sa lateralnih strana toraksa (Slika 2a). To su mesta odakle će se kod lutaka razviti respiratorni filament (škrge) (Dudley i Blair, 1992).

Posteriornu liniju glave karakteriše tanka sklerotizovana postokcipitalna margina (*postocciput*). Kod većine vrsta je ova postokcipitalna margina u središnjem delu sa dorzalne strane glave razdvojena, ostavljajući parne postokcipitalne sklerite slobodne. Kod nekih vrsta ova margina se skoro sastaje i uključuje postokcipitalne sklerite. Središnji deo dorzalne površine glave, koji se naziva cefalični apotom (*frontoclypeal apotome*), grubo je oivičen U linijom (*ecdysial line*) i poseduje specifične šare. One su mesta nakupljanja pigmenata, gde se mišići vezuju za integument (Slika 2b). Izgled ovih šara predstavlja morfološki karakter koji se koristi pri identifikaciji vrsta. Sa ventralne strane glavene čaure se na posteriornoj margini nalazi ventralni izrez (*postgenal cleft*). To je nepigmetisano polje, slabo skleratizovane kutikule, u obliku manjeg ili većeg udubljenja karakterističnog oblika (Slika 2c, 3a). Sa ventralne strane, anteriorno nalazi se submentum ili hipostoma (*hypostoma*) u obliku trapezoidne ploče (Slika 3b), koja je posteriorno odvojena hipostomalnim udubljenjem (*hypostomal groove*) a anteriorno je nazubljena u vidu izrazito sklerotizovanih zubića, čiji je izgled karakterističan za svaku vrstu (Slika 3c). Ostatak usnog aparata larvi simulida čine: mandibule, maksile, labrum i cefalične lepeze. Na unutrašnjoj margini mandibule nalaze se mandibularni zubi različitog oblika i broja (Slika 3d). Obično postoje tri vršna zuba, ispod kojih je niz zuba raspoređenih u vidu češlja. Na zadnjem delu mandibule nalaze se dva ili više malih zuba karakterističnih za vrstu. Vršni mandibularni zubi spajaju se sa zubima submentuma kako bi presekli niti svile koju produkuju pljuvačne žlezde larvi (Craig, 1977; Barr, 1982). Maksile su poprilično uniformne kod svih predstavnika familije i nose maksilarne palpuse (*palpus maxillaris*). Labrum se pojavljuje kao nastavak cefaličnog apotoma. Sa bočnih strana labruma nalaze se dve cefalične lepeze (*cephalic fans*) koje služe u filtriranju čestica hrane iz vode i predstavljaju najvažnije delove usnog aparata. U osnovi stabala cefaličnih lepeza nalaze se četvoročlane antene, kao i dobro razvijene steme/ocel – organi vida (Adler i sar., 2004).

Rektalne papile, odnosno trahiobranhije (*rectal papillae*) nalaze se sa dorzalne strane devetog (poslednjeg) abdominalnog segmenta larve. Sačinjene su od tri primarna lobusa, koji zavisno od vrste poseduju dodatne sekundarne lobuse (Slika 2d). One su retraktibilne i često se mogu uvući tako da se ne vide bez disekcije. Iza rektalnih papila nalazi se analni sklerit u obliku slova »X«, ređe »Y« (Slika 2d). Sa ventralne strane poslednjeg abdominalnog segmenta kod manjeg broja vrsta nalazi se par ventralnih papila (*ventral tubercles*).

Budući da morfološki karakteri variraju tokom razvića, identifikacija larvi se vrši samo na poslednjem stupnju razvića larvi.

UVOD



Slika 1. Opšti izgled larve simulide: cl - cefalična lepeza; s - stemate; hi - histoblast respiratornih filamenata; pp - pseudopodija; ro - rektalni organ; ad - adhezivni disk (fotografija: J. Đuknić).



Slika 2. Morfološki karakteri na telu larve simulide: a – lateralna strana abdomena sa histoblastima, b – dorzalna strana glavene čaure, c – ventralna strana glavene čaure, d – deveti abdominalni segment sa rektalnim papilama i analnim skleritom (fotografije: J. Đuknić).



Slika 3. Ventralna strana glave sa delovima usnog aparata: a – ventralni izrez, b – hipostoma, c – submentum, d – mandibula (fotografije: J. Đuknić).

1.2.2. Morfološke odlike lutaka simulida

Lutka, čije su dimenzije tela od 2 mm do 6 mm, nalazi se smeštena u kokonu (Slika 4a,e). Telo lutke prati uniformni obrazac građe kod svih vrsta simulida (Currie i Adler, 2008). Glaveni i grudni region lutke spojeni su u nepokretni cefalotoraks, dok je abdomen pokretan, sa dobro izraženom segmentacijom (Slika 4b). Dorzalna strana cefalotoraksa prekrivena je tuberkulama i dlakama koje mogu biti jednostavne ili razgranate (Ignjatović Čupina, 2011). Abdomen je sačinjen od devet segmenata na kojima se nalaze kukice raspoređene u transverzalne nizove (Slika 4c). One služe za vezivanje tela lutke za kokon. Pored njih, na zadnjem delu abdomena nekih vrsta postoji i par kaudalnih kukica sa istom funkcijom (Ignjatović Čupina, 2011). Na bočnim stranama toraksa nalaze se razgranati filamenti – škrge, koji čine respiratorne organe (Slika 4d). Izgled, broj i način grananja filamenata se razlikuje među vrstama i predstavlja najspecifičniji taksonomski karakter kod lutaka simulida.

Kokon je sačinjen od niti svile koje se luče iz pljuvačnih žlezda simulida (Slika 4f). Postoje dva glavna tipa kokona. Jedan je u vidu bezobličnog vrećastog rukava koji pokriva celu ili dobar deo lutke. Takav kokon ispredaju vrste roda *Prosimulium*. Drugi tip se javlja kod većine simulida u vidu dobro formirane „kućice“, specifične arhitekture. Na anteriornom delu nalazi se široki otvor, kroz koji prolazi deo cefalotoraksa sa respiratornim filamentima. Kokon se posteriorno sužava, a zadnji deo u potpunosti je zatvoren, čime poprima trouglasti oblik. Kod nekih vrsta, sa bočnih strana poseduje otvore u vidu prozora, kod drugih u središnjem delu poseduje prstoliki izraštaji, a kod nekih prednji deo kokona je odvojen od podloge formirajući „cipelicu“. Oblik kokona, njegova složenost i debljina variraju i često predstavljaju pouzdan taksonomski karakter (Adler i sar., 2004).



Slika 4. Izgled lutke i kokona simulide: a – lateralni prikaz lutke u kokonu, b – kokon, c – dorzalni prikaz lutke u kokonu, d – cefalotoraks sa respiratornim filamentima, e – respiratorni filament, f – abdomen (fotografije: J. Đuknić).

1.3. Ekologija

Larve i lutke simulida se mogu naći u svim tipovima tekućih voda. U povoljnim uslovima su veoma efikasni i oportunistički kolonizatori, tada gustina naseljenosti može dostići i do milion jedinki/m² (Wotton, 1988). Zbog svoje velike brojnosti, čine značajnu komponentu u zajednici makroinvertebrata. One predstavljaju važan izvor hrane brojnim akvatičnim insektima (dipterama, himenopterima, odonatama, trihopterima) i ribama (naročito salmonidnim vrstama) (Gislason i

Steingrímsson, 2004; Werner i Pont, 2006). Larve simulida su osetljive kako na pritisak predatora, tako i na kompeticiju s obzirom da su inferiorne u odnosu na druge organizme makroinvertebrata (Werner, 2004). Obično se nalaze veoma gusto naseljene u upražnjenim ekološkim nišama, mestima koja su drugim organizmima teška za kretanje i lov.

U velikim ravničarskim rekama simulide su obično zakačene za vegetaciju ili neku drugu veštačku podlogu kao što su užad za držanje čamaca, odloženo plastično smeće i sl. U manjim rekama sa brzim protokom vode, mogu se naći zakačene za površinu kamenja gde su izložene jakim hidrodinamičkim silama koje stvara vodena struja. Lutke formiraju kokone koji su donjim delom zalepljeni za površinu supstrata i štite ih, dok su larve, zahvaljujući adhezivnom disku na zadnjoj strani tela, čvrsto prikačene za površinu supstrata. Ove adaptacije sprečavaju simulide da budu odnešene jakom strujom za razliku od njihovih predatora i superiornih kompetitora i omogućavaju im da prežive u veoma brzom vodi. Tako pričvršćene, larve ostavljaju prednji deo tela da slobodno lebdi u vodi i sakuplja suspendovane čestice i rastvorenu organsku materiju pomoću para cefaličnih lepeza. Najveći broj vrsta samo filtrira hranu koju nosi vodeni tok, dok manji broj vrsta struže naslage čestica sa kamenja delovima usnog aparata. Ishrana larvi je raznovrsna, što zavisi od dostupnosti hrane i preferenci vrste. Najčešće se hrane dijatomejama, protozoama, bakterijama ili organskim česticama (Adler, 2022).

Neke vrste simulida zahtevaju vodu koja je brza, hladna, čista i bogata kiseonikom (Illešova i sar., 2008). Druge su adaptirane na sporije tokove, sa manjim sadržajem kiseonika i mogu tolerisati veliko organsko opterećenje, kao i visoke koncentracije ukupnog fosfora, azota i sumpora (Rivosecchi, 1978; Zhang i sar., 1998). Ove vrste se mogu naći vrlo brojne u vodenim ekosistemima u blizini poljoprivrednih polja, fabrika i gradova. S obzirom na izražene razlike u ekološkim preferencama simulida one se mogu smatrati dobrim pokazateljima stanja akvatičnih ekosistema. Iako su brojne i značajne, zbog veoma teške identifikacije i malog broja istraživača (taksonoma), često su zanemarena grupa organizama u hidroekološkim studijama i monitorinzima slatkovodnih ekosistema. Kada se analizira zajednica makrozoobentosa, oni se obično ostavljaju na nivou porodice.

Adultne simulide odlikuje veliki medicinski i socio-ekonomski značaj. Iako oba pola zahtevaju nektar kao izvor šećera koji predstavlja energiju za letenje i druge metaboličke potrebe, adultne ženke velikog broja vrsta (98%) su hematofagne i hrane se krvlju toplokrvnih životinja, uključujući i čoveka (Adler i sar., 2010; Adler i Crosskey, 2015). Tokom hranjenja krvlju mogu preneti različite patogene na svoje domaćine, kao što su: *Onchocerca* spp. (mikrofilarija) uzročnik bolesti „rečno slepilo“, *Leucocytozoon* spp. (protozoa) uzročnik ptičije malarije i *Trypanosoma* spp. (protozoa) uzročnik ptičije tripanozomijaze, Šagasove bolesti i „bolesti spavanja“ (Adler i sar., 2004; Zidková i sar., 2012). Ove mušice spadaju među četiri najznačajnije grupe vektorskih organizama (Adler i sar., 2010). Pored toga što prenose patogene, samo mesto uboda je podložno infekciji i alergijskoj reakciji. Često se dešava da se simulide jave u velikom broju te usled masovnog napada na stoku i živinu, životinja dospe u anafilaktički šok koji može biti fatalan (Živković, 1970a; Rivosecchi, 1978; Adler i sar., 2004; Ignjatović Čupina, 2011). Nekoliko puta u istoriji, velika rojenja simulida i brojni napadi na domaće životinje doveli su do masovnog izumiranja stoke i živine, i velikih ekonomskih gubitaka (Ciurea i Dinulescu, 1924; Baranov, 1926; Babić i sar., 1935; Simić i Živković, 1958; Živković, 1958; Živković, 1970; Živković i Burany, 1972).

Pored negativnih efekata, koje ženke adultnih stadijuma simulida imaju na životinje i ljude, simulidae su veoma značajne jer predstavljaju važnu kariku u mrežama ishrane. Adulti simulida predstavljaju plen mnogim paucima, terestičnim insektima i pticama (Ignjatović Čupina, 2011).

1.4. Sistematika i taksonomija

Prve opise nekih vrsta simulida dao je Karl Line 1758. godine, međutim svrstao ih je zajedno sa komarcima u rod *Culex*. I drugi autori su opisivali različite vrste simulida svrstavajući ih u isto tako pogrešne rodove i familije u okviru reda Diptera. Za čitavu familiju Simuliidae dugo se koristio naziv Melusinidae, koji se već neko vreme ne koristi usled nepostojanja tipske vrste po kojoj je dat opis roda (Ignjatović Čupina, 2011). Od 1802. godine u upotrebi je naziv Simuliidae. Dat je na osnovu roda *Simulium* koji je iste godine opisan po prvi put. Naziv roda je postao validan pošto je Latreille kao tipsku vrstu naveo *Simulium colombaschense* (Scopoli, 1780). Godine 1963. naziv familije Simuliidae je prihvaćen kao validan od strane Internacionalne komisije za zoološku nomenklaturu (ICZN) (Rivosecchi, 1978) i kao takav se i danas koristi (Adler, 2022). Rod *Prosimulium* je 1906. godine opisan kao podrod u okviru roda *Simulium*, da bi 1914. godine postao zaseban rod (Adler i Crosskey, 2009). Familija Simuliidae danas obuhvata ukupno 2415 vrsta svrstanih u 31 recentni i 9 izumrlih rodova (Adler, 2022).

Familija Simuliidae podeljena je u dve potfamilije: Parasimuliinae i Simuliinae. Potfamilija Parasimuliinae obuhvata samo jedan rod *Parasimulium*. Potfamilija Simuliinae se prema poslednjim ček listama deli u dva tribusa: Prosimuliini i Simuliini (Crosskey, 1990). U okviru tribusa Prosimuliini, od ukupno devet rodova, rod *Prosimulium* je najbrojniji sa čak 80 vrsta. Među 29 rodova unutar tribusa Simuliini, vrstama je najbogatiji rod *Simulium*, kome pripada više od 80% ukupnog broja opisanih vrsta simulida (Adler i Crosskey, 2009). Vrste ovog roda raspoređene su u 38 podrodova, a među njima najveći su: *Simulium* (550 opisanih vrsta), *Gomphostilbia* (304) i *Nevermannia* (248) (Adler i Crosskey, 2012).

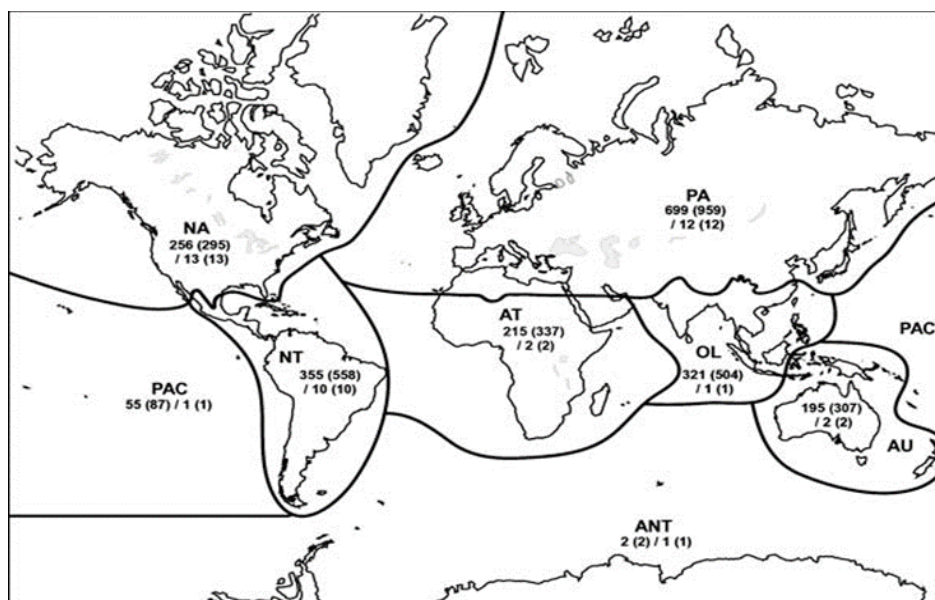
Sistematika familije Simuliidae se svakodnevno menja. Nove vrste se stalno opisuju, delom zbog upotrebe novih tehnika identifikacije koje su uspele da razdvoje vrste koje odlikuje značajna morfološka sličnost, a delom zato što je dobijen uvid i u savremenu specijaciju. Specijacija jeste kontinuiran proces, stoga savremena populaciona istraživanja pokazuju trenutne evolucione faze. Shodno tome, u trenutku analize granice specijacije nisu uvek jasne (Mallet, 2008; Hendry i sar., 2009; Conflitti i sar., 2017).

U poređenju sa drugim grupama Diptera, Simuliidae su morfološki veoma konzervativna grupa (Crosskey, 1990) sa problemima u definisanju taksonomskih kategorija: podrodova, grupa vrsta i vrsta. Zbog malih razlika u morfološkim karakteristikama, kao i velike fenotipske plastičnosti nekih taksona, često se dešavala pogrešna identifikacija i netačan opis novih vrsta (Adler i sar., 2010), te su mnoge opisane vrste na kraju označene kao sinonimi (Adler i Crosskey, 2018). Kao rezultat pogrešne identifikacije, i distribucija vrsta postaje upitna i podložna je revidiranju. Štaviše, netačna identifikacija može rezultirati neadekvatnim merama kontrole sa negativnim socio-ekonomskim ishodima (Hernández-Triana i sar., 2012). Nove studije politenih hromozoma ekstrahovanih iz pljuvačnih žlezda larve otkrile su visok kriptični biodiverzitet u familiji Simuliidae (Petrova i sar., 2003; Adler i Crosskey, 2015). Pokazalo se da su određeni taksoni, koji su se nekada smatrali jednom široko rasprostranjenom vrstom zapravo grupa sestrinskih vrsta (Rothfels, 1979; Adler i sar., 2010; Adler i sar., 2015). Identifikacija morfološki sličnih vrsta upotrebom molekularnih metoda takođe se pokazala podjednako uspešnom (Rivera, 2008; Rivera i Currie, 2009). DNK barkodiranje pomoću gena mitohondrijalne subjedinice 1 citohrom oksidaze (COI) često se koristi kako bi se otkrila raznolikost simulida (Day, 2008; Ilmonen i sar., 2009; Day i sar., 2010; Hernández-Triana i sar., 2012; Pramual i Nanork, 2012; Conflitti i sar., 2013; Sriphirom i sar., 2014; Inci i sar., 2017). Pored toga što mogu da se koriste u identifikaciji, molekularne metode se koriste i u cilju detekcije genetičke varijabilnosti (varijabilnost na nivou DNK) (Day i sar., 2008; Kúdela i sar., 2014). One mogu da ukažu na genetičku strukturiranost populacija, stopu protoka gena između njih, srodnost jedinki unutar lokalnih populacija, itd. Ove

metode služe i u biogeografskim studijama, jer rasvetljavaju populacione odnose pojedinačnih taksona i rekonstruišu evolutivnu i demografsku istoriju grupe (An i sar., 2022). Sve ovo čini taksonomiju i sistematiku simulida trenutno vrlo aktuelnom granom istraživanja. Veliki broj stručnjaka svakodnevno se bavi upotpunjavanjem podataka o novim rodovima, vrstama i citoformama simulida. Ček lista postojećih vrsta se svake godine revidira i dopunjava.

1.5. Distribucija

Vrste iz familije Simuliidae raspostranjene su u šest zoogeografskih regiona (Slika 5): PA/Palearktik (Holarktik), NT/Neotropiska oblast (Neogea), OL/Indomalajska oblast (Arktogea), NA/Nearktik (Holarktik), AU/Australijska, Novozelandska i Polinezijska oblast (Notogea) i AT/Etiopska i Madagaskarska oblast (Arktogea). Kada se posmatra globalna raznovrsnost čak 34,95% poznatih vrsta raspostranjeno je u Palearktiku, što ga svrstava u region sa najvećom brojnošću i raznovrsnošću simulida. Prate ga Neotropiski region (17,75%), Orijentalni (16,05%) i Nearktički (12,8%) (Currie i Adler, 2008).

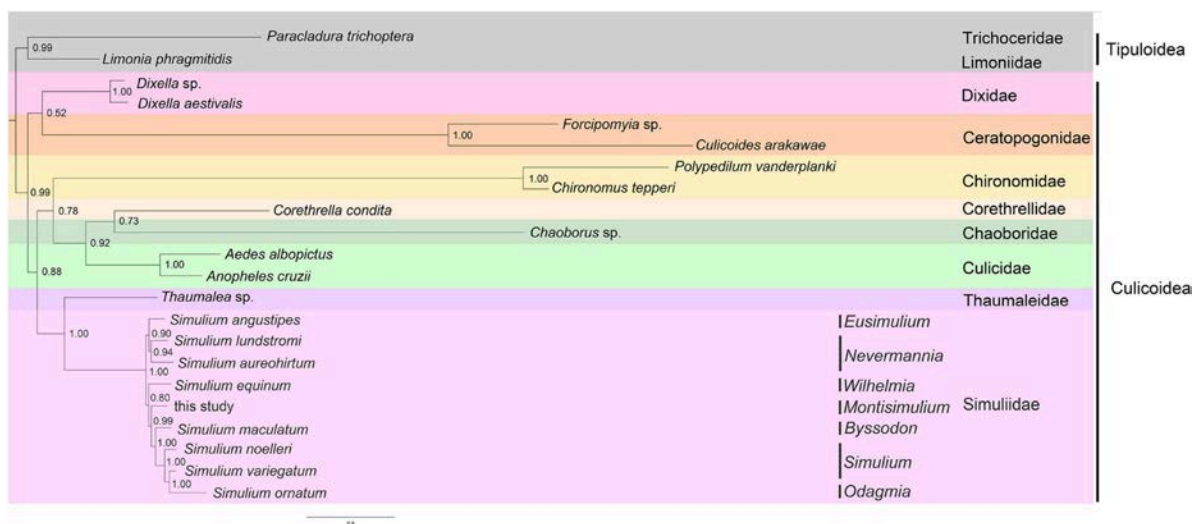


Slika 5. Raspostranjenje simulida po zoogeografskim regionima prema Currie i Adler, 2008.
Broj poznatih (broj predposavljenih) vsta/rodova.

1.6. Filogenija

Starost familije Simuliidae se prema fosilnom nalazu košuljice lutke iz srednje Jure procenjuje na 160 miliona godina (Crosskey, 1990). S druge strane, na osnovu rekonstrukcija filogenetskih odnosa familije Simuliidae i drugih familija natfamilije Culicoidea (Dixidae, Ceratopogonidae, Chironomidae, Corethrellidae, Chaoboridae, Culicidae, Thaumaleidae), pokazalo se da su se Simuliidae odvojile od Thaumaleidae u Trijasu, pre 239 miliona godina (An i sar., 2022). Prema pomenutim autorima familija Simuliidae ima monofiletsko poreklo i predstavlja sestrinsku grupu familiji Thaumaleidae (Slika 6). Unutar familije, Moulton ističe da je rod

Parasimulium evolutivno najstariji i predstavlja sestrinsku grupu svim ostalim simulidama (Moulton, 2000). Podrod *Nevermannia* ima monofiletsko poreklo, a podrod *Simulium* parafiletsko (An i sar., 2022). Rekonstrukcija filogenetskih stabala vrsta iz familije Simuliidae pokazala je da vrste formiraju dve visokopodržane grane (klade). Prva grana uključuje podrodove *Eusimulium* i *Nevermannia*. Druga grana uključuje podrodove *Simulium* i *Odagmia* koje predstavljaju sestrinsku grupu podroda *Bissodon*. Ove tri grupe (*Simulium*, *Odagmia* i *Bissodon*) predstavljaju sestrinsku grupu podroda *Montisimulium*. Čitava ova grana (*Montisimulium*, *Bissodon*, *Simulium* i *Odagmia*) je sestrinska grupa podrodu *Wilhelmia* (Slika 6).



Slika 6. Filogenetski odnosi simulida i sestrinskih familija (preuzeto iz An i sar, 2022).

Postoje brojne hipoteze o filogenetskim odnosima simulida, a jasniju sliku o odnosima unutar familije će dati istraživanja u koja je neophodno uključiti predstavnike svih rodova. Znanja o filogenetskim odnosima unutar simulida veoma su važna za razumevanje ekologije.

1.7. Pregled istraživanja familije Simuliidae na Balkanu

Prvi zapis simulida u Srbiji i Balkanu dao je Schöenbauer (1795), a odnosio se na medicinski značaj vrste *Simulium colombaschense* (Scopoli, 1780). Kasnije, krajem XIX i početkom XX veka, *S. colombaschense* na ovim prostorima ponovo privlači pažnju brojnih naučnika usled masovnih napada na stoku. Skoro sva tadašnja istaživanja simulida vezana su za ovu vrstu, njenu biologiju i primenljivost mera veterinarske prevencije u smanjenju njene brojnosti (Tömösváry, 1885; Ciurea i Dinulescu, 1924; Babić i sar., 1935).

Baranov je isticao važnost tačne identifikacije vrsta i započeo prva sistematska proučavanja simulida. Tokom svog radnog veka, u periodu od 1926. do 1942. godine, Baranov je opisao 43 taksona na teritoriji Kraljevine SHS/Jugoslavije (Crosskey, 1972), koja danas odgovaraju nazivima svega 14 vrsta (Ignjatović Čupina, 2011). Vrste *Simulium savici* (Baranov, 1937) i *Simulium croaticum* (Baranov, 1937) su jedine koje još uvek nose Baranovo ime kao prvog autora (Crosskey i Peterson, 1972), dok su ostali taksoni uključeni u spisak sinonima za validna imena vrsta (Ignjatović Čupina, 2011).

U periodu od 1946. do 1975. godine, faunom simulida na teritoriji SFRJ/Jugoslavije bavila se Vera Živković. Intenzivno je proučavala simulide toka Dunava kroz Srbiju i identifikovala 11 vrsta, među kojima su dominantne bile *S. erythrocephalum* i *S. balcanicum*, u gornjem delu toka, i *S.*

colombaschense u donjem delu toka (Živković, 1967a; Živković, 1971). U svom kasnijem radu, proučavala je faunu simulida visokoplaninskih reka i potoka u Srbiji, faunu simulida Makedonije, Bosne i Hercegovine, Slovenije i Hrvatske (Ignjatović Čupina, 2011). Živković je do 1961. godine prikupila uzorke sa 175 reka, na teritoriji bivše Jugoslavije, identifikovala 26 vrsta i primetila da je *S. ornatum* najdominantnija vrsta na čitavoj teritoriji. Tokom svog radnog veka utvrdila je prisustvo 58 formi simulida (Živković, 1970a) i opisala tri vrste i jednu formu kao nove za nauku. Naziv vrste *Simulium ibariense* Zivkovitch i Grenier, 1959 je i dalje validan, dok su ostali uključeni u listu sinonima (Ignjatović Čupina, 2011).

Nakon 25 godina prekida u periodu od 1975. do 2000. godine, istraživanja simulida u Srbiji obnovila je Aleksandra Ignjatović Čupina sa saradnicima. Naglasak je ponovo stavljen na mamofilne i antropofilne vrste. Ignjatović Čupina je dala listu od devet vrsta simulida na teritoriji Novog Sada (Ignjatović Čupina i sar., 2003). Zajedno sa autorima Zgomba i Petrić, sprovodi različita istraživanja na temu simulida, od upotrebe larvicidnih tretmana za njihovo suzbijanje, do odnosa između simulida i drugih organizama (Ignjatović Čupina i sar., 2005; Ignjatović Čupina i sar., 2006; Petrić i sar., 2006a; Zgomba i sar., 2004). Ignjatović Čupina sprovela je veoma opsežnu studiju o vrstama simulida prisutnim na području Fruške Gore i njihovoj sezonskoj dinamici (Ignjatović Čupina, 2011). Nakon istraživanja Ignjatović Čupina, taksonomsko faunistička istraživanja simulida nastavljena su tokom izrade ove doktorske disertacije.

Detaljnijim proučavanjem faune simulida na Plitvičkim Jezerima u Hrvatskoj posvetila se Marija Ivković (Ivković i sar., 2012). Ivković je sa saradnicima 2016. godine dala pregled simulida u Hrvatskoj, sa osvrtom na bogatstvo vrsta i njihovu distribuciju. Na osnovu svih prethodno objavljenih podataka vezanih za simulide konstatovano je prisustvo 28 vrsta na teritoriji Hrvatske (Ivković i sar., 2016).

Prva molekularna i citogenetička istraživanja simulida na ovim prostorima sprovedena su na vrsti *S. colombaschense* (Scopoli, 1780), kada je istražen čitav genom vrste (Adler i sar., 2016). Genetička varijabilnost i filogenetski odnosi vrsta iz familije Simuliidae na Balkanu analizirani su tokom izrade ove doktorske disertacije (Đuknić i sar, 2019; Đuknić i sar, 2020).

Prema poslednjim podacima iz ček liste (Adler, 2022) na Balkanu je do sada zabeleženo prisustvo 70 vrsta simulida iz 3 roda: *Prosimulium*, *Metacnephia* i *Simulium*. Rod *Simulium* zastupljen je sa 7 podrodova: *Boophthora*, *Byssodon*, *Eusimulium*, *Nevermannia*, *Simulium*, *Trichodagmia* i *Wilhelmia*. Spisak rodova, podrodova, grupa vrsta i vrsta prisutnih na Balkanu dat je u Tabeli 1. Balkansko poluostrvo karakteriše prisustvo šest endemskih vrsta (Adler, 2022): *Metacnephia uzunovi* Kovachev 1985 i *Simulium simoffi* Enderlein 1924 – Bugarska, *Simulium flexibranchium* Crosskey 2001 – Grčka, *Simulium croaticum* Baranov 1937 – Hrvatska, *Simulium savici* Baranov 1937 – Hrvatska i Srbija, *Metacnephia danubica* Rubtsov 1956 – Srbija i Rumunija.

Tabela 1. Spisak vrsta simulida prisutnih na Balkanskom poluostrvu (Adler, 2022).

	SLO	HR	BIH	CG	SRB	ALB	MAK	BUG	GR
rod Prosimulium									
HIRTIPES grupa vrsta									
<i>P. fluvipes</i> (Edwards, 1921)			*						
<i>P. hirtipes</i> (Fries, 1824)	*		*						
<i>P. latimucro</i> (Enderlein, 1925) (complex)			*	*				*	
<i>P. petrosum</i> Rubtsov, 1955								*	
<i>P. rachiliense</i> Djafarov, 1954 (complex)								*	*
<i>P. rufipes</i> (Meigen, 1830) (complex)	*		*	*	*			*	*
<i>P. tomosvaryi</i> (Enderlein, 1921)	*	*	*		*			*	*

UVOD

Nastavak **tabele 1.**

	SLO	HR	BIH	CG	SRB	ALB	MAK	BUG	GR
rod METACNEPHIA									
<i>M. blanci</i> (Grenier & Theodorides, 1953)					*		*		
<i>M. uzunovi</i> Kovachev, 1985								*	
<i>M. villosa</i> (DeFoliart & Peterson, 1960)									*
<i>M. danubica</i> Rubtsov 1956	*	*	*	*	*				
rod SIMULIUM Latreille									
podrod BOOPHTHORA Enderlein									
<i>S. erythrocephalum</i> (De Geer, 1776)	*	*			*				*
podrod BYSSODON Enderlein									
MERIDIONALE grupa vrsta									
<i>S. maculatum</i> (Meigen, 1804)					*				
podrod EUSIMULIUM Roubaud									
<i>S. angustipes</i> Edwards, 1915			*	*	*		*		
<i>S. aureum</i> Fries, 1824					*				
<i>S. petricolum</i> (Rivosecchi, 1963)			*		*				*
<i>S. rubzovianum</i> (Sherban, 1961)	*	*	*	*	*		*		*
<i>S. flexibranchium</i> Crosskey 2001									*
podrod NEVERMANNIA Enderlein									
RUFICORNE grupa vrsta									
<i>S. angustitarse</i> (Lundström, 1911)	*	*	*	*	*		*		*
<i>S. ibleum</i> (Rivosecchi, 1966)									*
<i>S. lundstromi</i> (Enderlein, 1921)		*			*			*	
VERNUM grupa vrsta									
<i>S. angustatum</i> (Rubtsov, 1956)					*				
<i>S. beltukovae</i> (Rubtsov, 1956)†	*				*				
<i>S. bertrandi</i> Grenier & Dorier, 1959			*	*				*	
<i>S. brevidens</i> (Rubtsov, 1956)			*	*	*				
<i>S. codreanui</i> (Sherban, 1958)			*		*			*	
<i>S. costatum</i> Friederichs, 1920	*	*	*	*				*	
<i>S. crenobium</i> (Knoz, 1961)	*		*		*				
<i>S. cryophilum</i> (Rubtsov, 1959) (complex)	*	*	*	*	*			*	*
<i>S. vernum</i> Macquart, 1826	*	*	*		*				
podrod SIMULIUM Latreille									
ARGENTEOSTRIATUM grupa vrsta									
<i>S. argenteostriatum</i> Strobl, 1898	*		*	*	*			*	
BEZZII grupa vrsta									
<i>S. alajense</i> Rubtsov, 1938								*	
<i>S. bezzii</i> (Corti, 1914) (complex)		*	*	*	*		*	*	*
<i>S. desertorum</i> Rubtsov, 1938								*	
<i>S. kerisorum</i> Rubtsov, 1938								*	
BUKOVSKII grupa vrsta									
<i>S. degrangei</i> Dorier & Grenier, 1960		*		*	*			*	*
MALYSCHEVI grupa vrsta									
<i>S. ibariense</i> Zivkovitch & Grenier, 1959					*		*	*	
NOELLERI grupa vrsta									
<i>S. noelleri</i> Friederichs, 1920 (complex)	*		*		*				

Nastavak **tabele 1.**

	SLO	HR	BIH	CG	SRB	ALB	MAK	BUG	GR
ORNATUM grupa vrsta									
<i>S. baracorne</i> Smart, 1944					*			*	*
<i>S. croaticum</i> (Baranov, 1937)		*							
<i>S. intermedium</i> Roubaud, 1906	*			*	*			*	
<i>S. ornatum</i> Meigen, 1818 (complex)	*	*	*	*	*		*	*	*
<i>S. rotundatum</i> (Rubtsov, 1956)								*	
<i>S. savici</i> (Baranov, 1937)		*			*				
<i>S. simoffi</i> (Enderlein, 1924)								*	
<i>S. trifasciatum</i> Curtis, 1839	*	*						*	*
REPTANS grupa vrsta									
<i>S. colombaschense</i> (Scopoli, 1780)		*	*		*		*	*	*
<i>S. reptans</i> (Linnaeus, 1758) (complex)	*	*	*	*	*		*	*	
<i>S. reptantoides</i> Carlsson, 1962 (complex)		*	*	*	*			*	
<i>S. voilense</i> Sherban, 1960		*			*				
TUBEROSUM grupa vrsta									
<i>S. tuberosum</i> (Lundström, 1911)	*	*	*					*	
<i>S. vulgare</i> Dorogostaisky, Rubtsov & Vlasenko, 1935					*				
VARIEGATUM grupa vrsta									
<i>S. argyreatum</i> Meigen, 1838	*	*	*	*	*		*	*	*
<i>S. debaculi</i> Terteryan, 1952								*	
<i>S. maximum</i> (Knoz, 1961)			*		*			*	
<i>S. monticola</i> Friederichs, 1920	*	*	*		*		*	*	
<i>S. monticoloides</i> (Rubtsov, 1956)								*	
<i>S. variegatum</i> Meigen, 1818	*	*	*	*	*			*	*
VENUSTUM grupa vrsta									
<i>S. morsitans</i> Edwards, 1915	*								
<i>S. paramorsitans</i> Rubtsov, 1956			*		*			*	
<i>S. posticatum</i> Meigen, 1838	*								
Subgenus TRICHODAGMIA Enderlein									
ALBELLUM grupa vrsta									
<i>S. auricoma</i> Meigen, 1818		*			*			*	*
<i>S. popowae</i> Rubtsov, 1940								*	
Subgenus WILHELMIA Enderlein									
EQUINUM grupa vrsta									
<i>S. angustifurca</i> (Rubtsov, 1956)								*	
<i>S. balcanicum</i> (Enderlein, 1924)	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>S. equinum</i> (Linnaeus, 1758)	*	*	*	*	*		*	*	
<i>S. lineatum</i> (Meigen, 1804)	*	*	*	*	*			*	
<i>S. paraequinum</i> Puri, 1933 (complex)		*		*	*			*	
<i>S. pseudequinum</i> Séguy, 1921 (complex)	*	*	*	*	*		*	*	*
<i>S. turgaicum</i> Chen & Luo, 2006	*		*						

CILJEVI

CILJEVI

Istraživanje diverziteta i genetičke varijabilnosti porodice Simuliidae na području Balkanskog poluostrva realizovano je sa sledećim ciljevima:

- Utvrđivanje faunističkog sastava porodice Simuliidae na području Balkanskog poluostrva na osnovu morfoloških karakteristika larvi i lutaka.
- Potvrda morfološki identifikovanih vrsta primenom molekularnih metoda (analiza DNK sekvenci mitohondrijskog COI gena).
- Utvrđivanje genetičke varijabilnosti odabranih vrsta porodica *Wilhelmia* i REPTANS grupe vrsta.
- Utvrđivanje filogenetskih odnosa unutar odabranih vrsta porodica *Wilhelmia* i REPTANS grupe vrsta.
- Analiza zajednica simulida u različitim tipovima staništa (sastav i distribucija) i analiza ekoloških preferenci odabranih vrsta.

MATERIJAL I METODE

3.1. Opis istraživanih lokaliteta i karakteristike staništa

Balkansko poluostrvo (Balkan) nalazi se na Jugoistoku Evrope. Prostire se između 35° i 47° severne geografske širine i između 13° i 29° istočne geografske dužine. Predstavlja poluostrvo, ali i kulturno područje sa granicama koje su sporne i koje se vrlo često različito tumače. Nosi naziv po planini Balkan (Stara planina) koja se proteže od istoka Srbije do Crnog mora na istoku Bugarske. Balkan je okružen morima: Jadranskim morem na zapadu, Jonskim na jugozapadu, Egejskim na jugu, Mramornim na jugoistoku, a Crnim morem na istoku. Severnu granicu Balkana predstavljaju reke Dunav i Sava. Površina Balkana iznosi približno 550.000 km². U pogledu reljefa, na severu je od Panonske nizije i ostatka Evrope odvojen rekama Savom i Dunavom. Karakteriše ga plavno područje ovih reka i njihovih najvećih pritoka Bosne, Une, Drine, Kolubare i Velike Morave. Na zapadu i jugozapadu prostire se planinski masiv Dinarskih Alpa (Dinarida). Pružaju se pravcem severozapad–jugoistok, prateći Jadransku obalu. Dinaridi se prostiru kroz Sloveniju, Hrvatsku, Bosnu i Hercegovinu, Srbiju, Crnu Goru i Albaniju. Ovaj planinski masiv je formiran uglavnom u mezozoiku i kenozoiku tokom Alpske orogeneze od sedimentnih, pretežno krečnjačkih stena. Odlikuju ga kraška polja, vrtače, pećine i reke ponornice. Neke od najdubljih klisura i kanjona na svetu nalaze se na Balkanu (kanjoni Tare, Lima, Morače, Vrbasa i Neretve). Na dinarski masiv se nastavlja Šarsko–Pindski masiv. Centralni deo Balkanskog poluostrva zauzimaju Rodopske planine. Prostiru se od Dinarida na zapadu do Karpata na severoistoku. Rodopske planine se pružaju kroz Srbiju, Bugarsku i Severnu Makedoniju. Ovaj planinski masiv je najstariji na Balkanu, formiran je u gornjem paleozoiku od kristalastih škriljaca, sa mermerom, granitom i vulkanskim stenama.

Hidrološka mreža na Balkanskom poluostrvu otiče u četiri morska sliva: Crnomorski, Jadranski, Jonski i Egejski. Tako Crnomorski sliv čine Dunav sa svojim pritokama Savom, Kolubarom, Velikom Moravom, Mlavom, Pekom i Timokom. U Savu se ulivaju velike reke kao što su Krupa, Una (sa Sanom), Vrbas (sa Plivom, Ugarom, Vrbanjom), Bosna i Drina (sa Sutjeskom, Bistricom, Janjem, Čehotinom, Limom, Rzavom i Jadrom). Velika Morava nastaje spajanjem Južne Morave (sa najvažnijim pritokama: Jelašnicom, Vrlom, Vlasinom, Nišavom, Sokobanjskom Moravicom, Vranjskom rekom, Veternicom, Jablanicom, Pustom rekom) i Zapadne Morave (sa Ibrom, Rasinom, Đetinom, Skrapežom, Moravicom, Velikim Rzavom, Čemernicom, Kamenicom). Jadranski sliv čine Krka, Cetina, Trebišnjica, Neretva (sa Bunom i Bregalnicom), Zrmanja, Zeta, Morača, Bojana/Buna i Drim/Drin, Vojuše, Semeni, Škumbe i sliv reke Maće. Egejski sliv čine Vardar (sa Pčinjom, Crnom rekom i Bregalnicom), Struma (sa Dragovišticom, Rilom, Strumicom), Bistrica (grč. *Haliacmon*), Marica (sa Adrom), Mesta (grč. *Nestos*) i Penej (grč. *Pineios*). Jonskom slivu pripadaju: Alfej (grč. *Alfeios*), Ahelaj (grč. *Achelous*) kao i reka Eurotas.

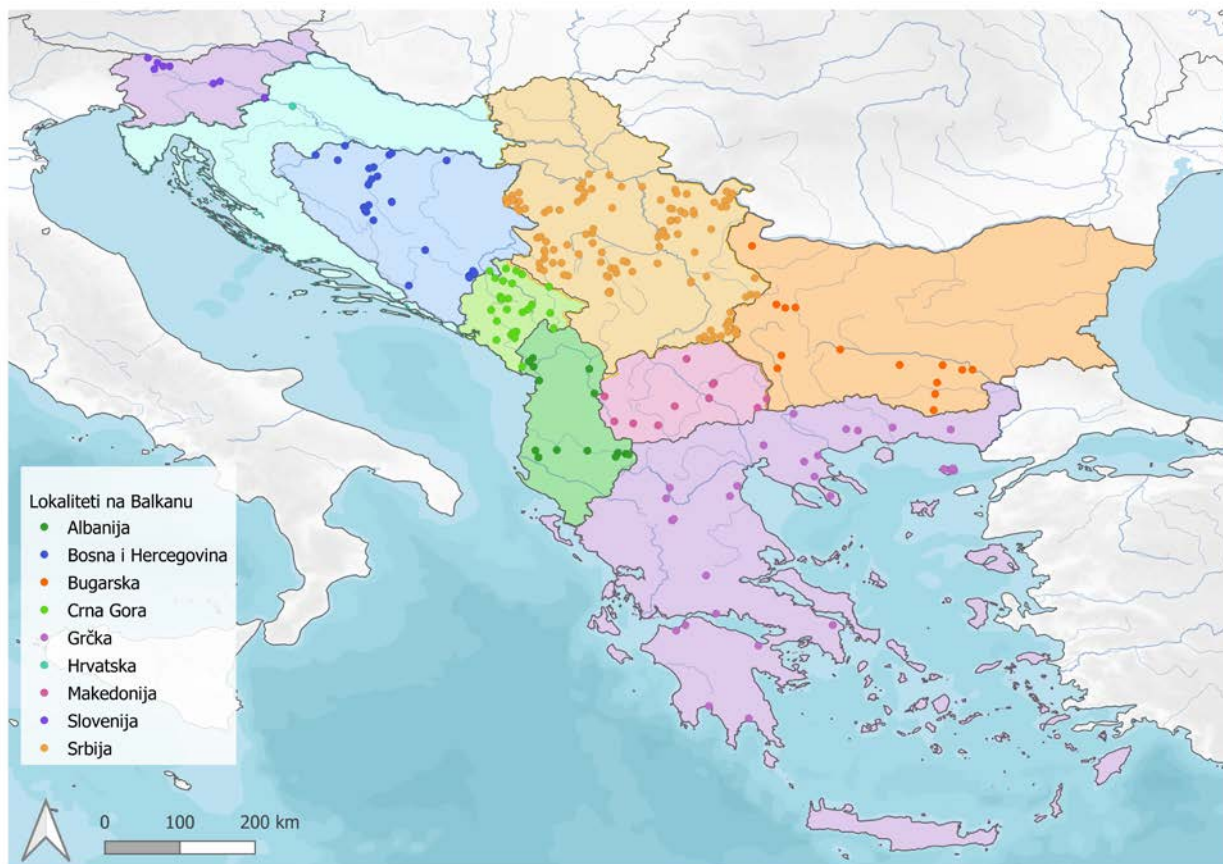
Klima Balkanskog poluostrva je raznolika. Balkan je najvećim delom preko Panonskog basena pod uticajem klime centralne Evrope. Na planinama je planinska klima, dok je u dolinama zastupljena umereno kontinentalna. Kotline su pod uticajem subplaninske klime. Idući prema severu klima postaje izrazito kontinentalna. Pod uticajem Crnog mora su samo istočni delovi Balkanskog poluostrva, dok je mediteranska klima zastupljena samo u uskoj zoni uz Jadransku obalu i na obalama Jonskog i Egejskog mora. Visoki planinski masivi sprečavaju prodor mediteranske klime dublje u kopno.

Za mnoge organizme Balkansko poluostrvo predstavljalo je utočište tokom pleistocenskih ledenih doba (Hewitt, 1999), usled čega danas sa svojom karakterističnom faunom i endemskim vrstama predstavlja jedan od centara biodiverziteta (Raković i sar., 2022).

Tokom ovog istraživanja uzorci larvi i lutaka simulida prikupljeni su sa 256 lokaliteta širom Balkanskog poluostrva (Slika 7): 120 lokaliteta sa teritorije Srbije, 8 lokaliteta u Sloveniji, 1 lokalitet u Hrvatskoj, 30 lokaliteta u Bosni i Hercegovini, 27 u Crnoj Gori, po 14 lokaliteta u Albaniji i Bugarskoj, 12 lokaliteta u Makedoniji i 30 u Grčkoj.

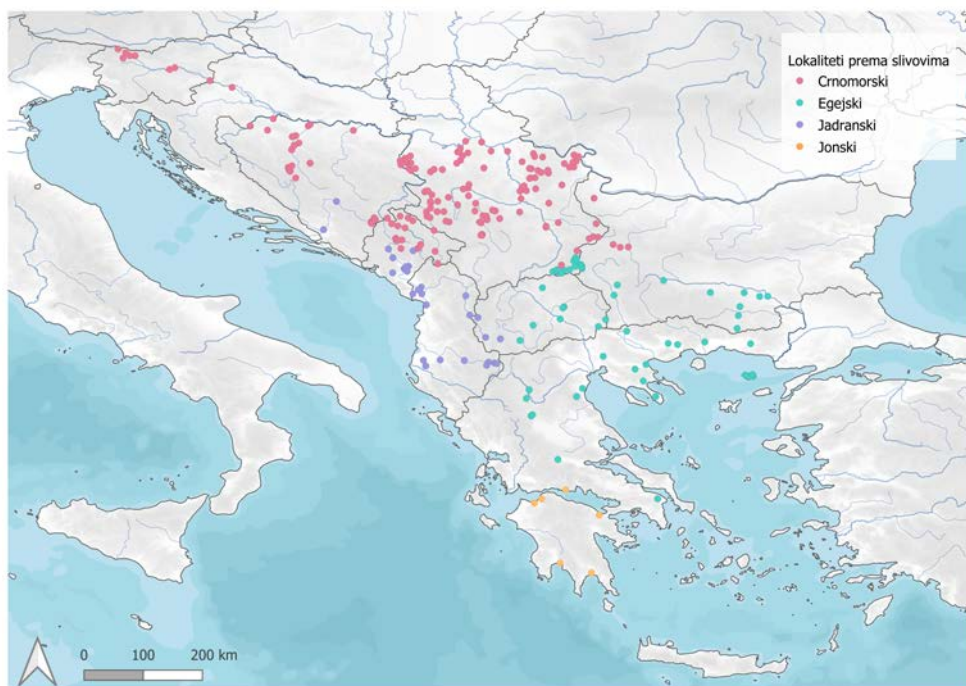
Spisak lokaliteta i tipologija (geografska širina i dužina, nadmorska visina, tip vodotoka, sliv i hidroekoregion kome lokaliteti pripadaju) su prikazane u prilogu 1.

Mape istraživanog područja i rasprostranjenja vrsta izrađene su u programskom paketu QGIS v3.16 (eng. *Quantum GIS*) (QGIS, 2021).

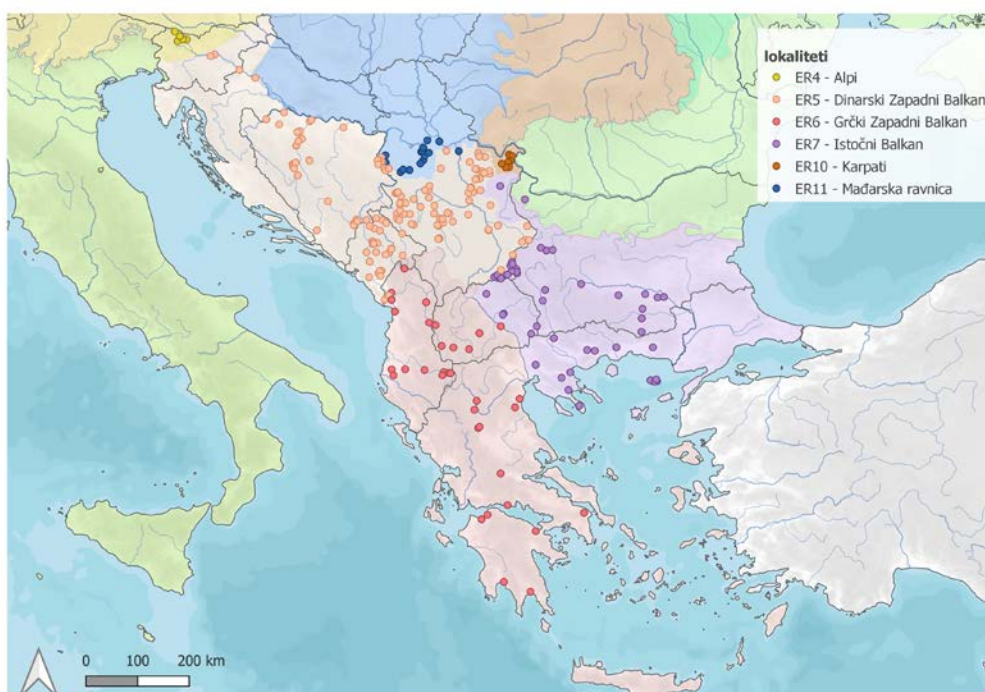


Slika 7. Mapa istraživanih lokaliteta.

Reke sa kojih su prikupljeni uzorci otiču u četiri sliva: Crnomorski, Jadranski, Jonski i Egejski sliv (Slika 8, Prilog 1), a sami lokaliteti se nalaze u šest različitih hidroekoregiona: Alpi (ER4), Dinarski Zapadni Balkan (ER5), Grčki Zapadni Balkan (ER6), Istočni Balkan (ER7), Karpati (ER10) i Mađarska ravnica (ER11) (Slika 9, Prilog 1). Granice hidroekoregiona definisane su prema Illies (1978), dok su granice na teritoriji Srbije modifikovane prema Paunović i sar. (2012). Lokaliteti su izabrani tako da se pokrije što više različitih tipova vodnih tela u cilju istraživanja što većeg diverziteta. Odabrani vodotoci i lokaliteti na njima odlikuju se razlikama u opštim karakteristikama kao što su veličina vodnog tela, tip podloge, turbulentnost toka, opšti fizički i hemijski parametri vode i dostupnost hrane za vodene organizme.

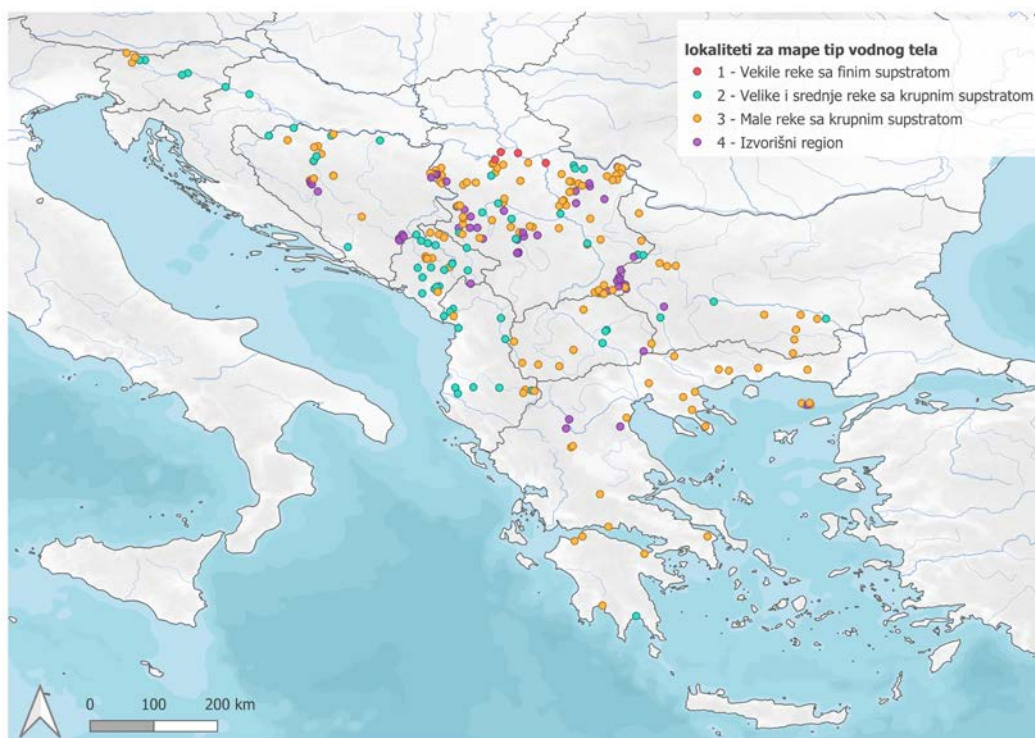


Slika 8. Mapa istraživanja lokaliteta prema slivu kojim pripadaju reke



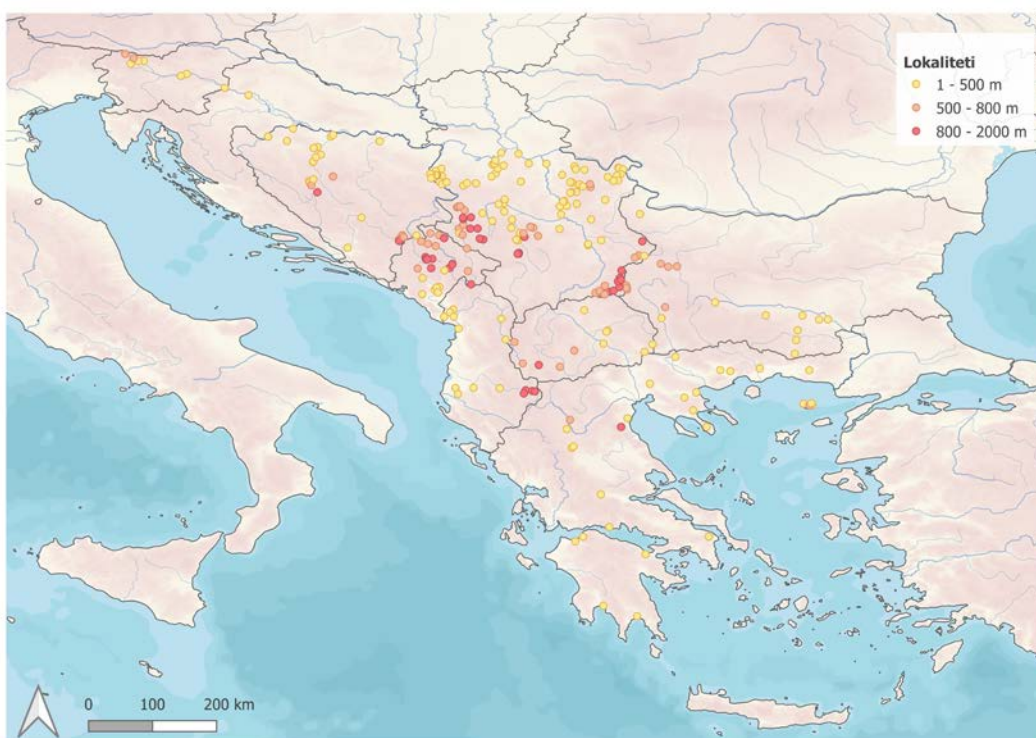
Slika 9. Mapa istraživanja lokaliteta prema hidroekoregionima (Illies,1978; Paunović i sar., 2012)

Kako su simulide prisutne u svim tipovima tekućih voda, radi preciznije analize distribucije najčešćih vrsta simulida, istraživana vodna tela su grupisana u četiri tipa vodotokova, na osnovu parametara za grupe tipova koji su korišćeni u nacionalnoj legislativi kao podloga za ocenu ekološkog statusa (Sl. Glasnik 72/2011). Tipu 1 (T1) pripadaju velike ravničarske reke kao i donji delovi njihovih najvećih pritoka. Karakteriše ih veoma fin sediment (mulj, glina i pesak). U tipu 2 (T2) nalaze se velike i srednje reke s čvrstim supstratom krupne granulacije (šljunak i kamenje). U tip 3 (T3) svrstani su mali vodotoci sa čvrstim supstratom krupne granulacije (šljunak, kamenje i stene), a u tip 4 (T4) mala vodna tela, izvori i izvorišne zone potoka i planinskih reka, koje takođe karakteriše čvrst supstrat krupne granulacije (šljunak, kamenje i stene). Na slici 10 može se videti raspodela lokaliteta prema tipu vodnog tela kom pripadaju (Prilog 1).



Slika 10. Mapa istraživanih lokaliteta prema tipu vodotoka

Distribucija lokaliteta prema nadmorskoj visini prikazana je na slici 11, pri čemu su sve nadmorske visine svrstane u tri kategorije: NV1 (0-500 m), NV2 (500-800 m) i NV3 (preko 800 m) (Prilog 1).



Slika 11. Mapa istraživanih lokaliteta prema kategorijama nadmorskih visina.

3.2. Prikupljanje i obrada uzoraka

Uzorci simulida obrađeni tokom ovog istraživanja prikupljeni su u periodu od 2013. do 2021. godine. Larve i lutke simulida sakupljene su ručnom bentološkom mrežom (promera okaca 500 μm) prema modifikovanom AQEM protokolu (AQEM Consortium, 2002). Na ovaj način uzorci su prikupljeni sa svih dostupnih staništa prema procentualnoj zastupljenosti (Slika 12). Pored ovog, jedinke su na većini lokaliteta sakupljene i pincetom sa različitih tipova dostupnih podloga: površine kamena, oborenih debala, površina vodenih biljaka, kao i sa čvrstog komunalnog otpada, plastičnih flaša, tegli, diskova, različitih tipova folije i kesa koje su dospale u vodeni tok (Slika 12).



Slika 12. Tehnike prikupljanja simulida i različiti tipovi supstrata (fotografije: S. Anđus, J. Đuknić, N. Marinković).

Uzorci su na terenu fiksirani 70% etanolom, adekvatno obeleženi i transportovani u laboratoriju Odeljenja za hidroekologiju i zaštitu voda Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“- Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, gde su dalje obrađivani.

Za identifikaciju vrsta na osnovu morfoloških karaktera, kao i njihovo fotografisanje, korišćene su binokularne lupe Nikon SMZ800N (uveličanja 10-80x) sa kamerom Nikon DS-Fi2, Zeiss Stemi 2000-C (uveličanja 6.5-50x) sa kamerom AxioCam ERc 5s kao i svetlosni mikroskop Carl ZEISS Axio Lab.A1 (uvećanja 1000x) sa kamerom AxioCam ERc 5s. Fotografije su pored kamera na lupama i mikroskopu napravljene fotoaparatom Panasonic Lumix fz-28 i Nikon D5200. Jedinke su identifikovane morfološki do nivoa vrste kada je to bilo moguće ili su ostavljene na najnižem mogućem taksonomskom nivou, koristeći sledeće identifikacione ključeve: Rubtsov, 1956; Knoz, 1965; Rivosecchi, 1978; Crosskey, 2002; Yankovsky, 2002; Jedlička i sar., 2004; Lechthaler i Car, 2005. Verifikacija identifikovanog materijala izvršena je tokom dvonedeljne posete na odeljenju za zoologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta Komenského u Bratislavi, od starne kolega dr Tatijane Kudelovoj (*Tatiana Kúdelová*) i dr Matuša Kudeli (*Matus Kúdela*).

3.3. Molekularne analize

U cilju potvrde identifikovanih vrsta na osnovu morfoloških karaktera, kao i određivanja genetičke varijabilnosti simulida urađene su molekularne analize na jedinkama vrsta iz podroda *Wilhelmia*, kao i na morfološki sličnim vrstama iz REPTANS grupe vrsta: *Simulium reptans* i *S. reptantoides*.

Izolacija genetičkog materijala (DNK) i njegova amplifikacija (umnožavanje) lančanom reakcijom polimeraze (PCR) rađene su u laboratoriji Odeljenja za genetiku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“- Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Jedinke larvi iz kojih se vršila izolacija DNK najpre su pripremljene uklanjanjem digestivnog trakta kako ne bi došlo do kontaminacije drugim izvorima DNK. Glavna kapsula i zadnji deo tela larvi, kao i škrge lutaka sačuvani su u 95% etanolu za potvrdu morfoloških analiza. Ostatak tela je korišćen za ekstrakciju DNK. Svaka jedinka je isprana destilovanom vodom, osušena i usitnjena oštrim makazama sa finim vrhom. Usitnjeno tkivo je zatim prenošeno u tubice zapremine 1,5 ml. Kako bi se sprečila kontaminacija između uzoraka, pribor je između svakog narednog uzorka ispiran prvo u 70% etil- alkoholu, a zatim i u destilovanoj vodi.

3.3.1. Izolacija DNK, amplifikacija lančanom reakcijom polimeraze (PCR) i sekvenciranje

Izolacija genetičkog materijala je urađena korišćenjem kita za izolaciju KAPA2G Express Extract Kit (Kapa Biosystems, Sjedinjene Američke Države, Vilmington, Masačusets) sledeći uputstva proizvođača. Kvalitet DNK je proveren elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Barkodirajući region mitohondrijalnog COI gena amplifikovan je iz ukupno 66 jedinki, osam morfološki identifikovanih vrsta: *Simulium balcanicum* (Enderlein, 1924) (18), *S. lineatum* (Meigen, 1804) (3), *S. pseudequinum* Séguy, 1921 (9), *S. equinum* (Linnaeus, 1758) (11), *S. paraequinum* Puri, 1933 (4), *S. turgaicum* Rubtsov, 1940 (2), *S. reptans* (Linnaeus, 1758) (5), *S. reptantoides* Carlsson, 1962 (14). Lokaliteti sa kojih su prikupljene vrste iz kojih je izolovan DNK materijal prikazani su u tabeli 2. Na slici 13 prikazana je distribucija vrsta u okviru podroda *Wilhelmia* na osnovu sekvenci, dok je na slici 14 prikazana distribucija vrsta *S. reptans* i *S. reptantoides*.

MATERIJAL I METODE

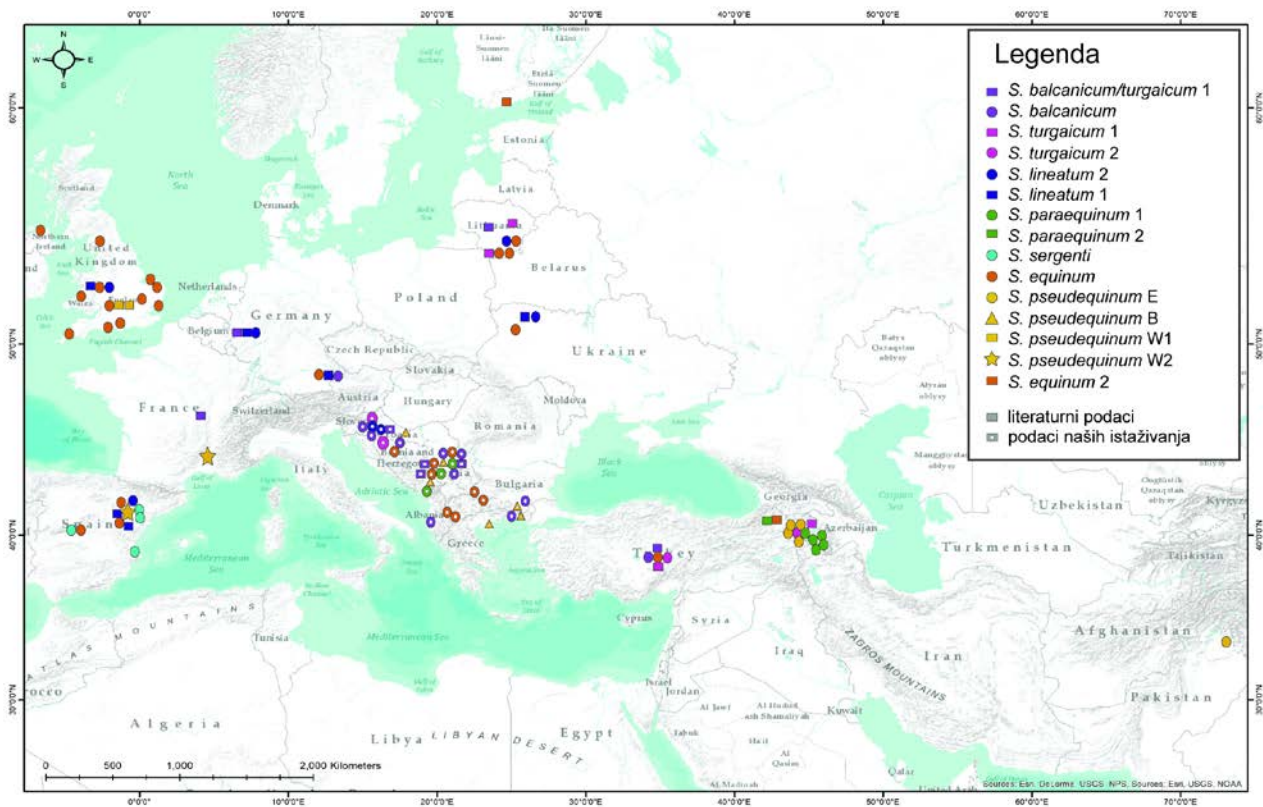
Tabela 2. Podaci za vrste prikupljene u periodu od 2014. do 2017. iz kojih je izolovana mtDNK. Imena vrsta (klada) su data prema rezultatima ove studije. Broj sekvence označava pristupni broj pod kojim je sekvenca pohranjena u bazi GenBank. Skraćenice u tabeli: St. – Stadijum; Drž – država; Geo. – geografska; SRB – Srbija, HRV – Hrvatska, SLO – Slovenija, ALB – Albanija, BUG – Bugarska, BIH – Bosna i Hercegovina, CRG – Crna Gora, Mak – Makedonija, GRČ – Grčka.

Broj sekvence	Klada (potencijalna vrsta)	St.	Reka	Drž.	Geo. širina	Geo. dužina	Datum sakupljanja	Kolektor
MH549547	<i>S.balcanicum/turgaicum</i> 1	Lutka	Lim	SRB	43.393293	19.642978	9 Avg 2016	Đuknić J.
MH549569	<i>S.balcanicum/turgaicum</i> 1	Lutka	Lim	SRB	43.393293	19.642978	9 Avg 2016	Đuknić J.
MH549570	<i>S.balcanicum/turgaicum</i> 1	Lutka	Despotovica	SRB	43.975009	20.419295	10 Avg 2016	Đuknić J.
MH549568	<i>S.balcanicum/turgaicum</i> 1	Larva	Sava	HRV	45.759639	16.047861	4 Sep 2015	Đuknić J.
MH587354	<i>S.balcanicum/turgaicum</i> 1	Larva	Lim	SRB	43.393293	19.642978	9 Avg 2016	Đuknić J.
MH549567	<i>S.balcanicum/turgaicum</i> 1	Lutka	Čemernica	SRB	43.909483	20.403543	10 Avg 2016	Đuknić J.
MH587353	<i>S.balcanicum/turgaicum</i> 1	Lutka	Čemernica	SRB	43.909483	20.403543	10 Avg 2016	Đuknić J.
MH587357	<i>S. balcanicum</i>	Larva	Čemernica	SRB	43.909483	20.403543	10 Avg 2016	Đuknić J.
MH587355	<i>S. balcanicum</i>	Lutka	Pek	SRB	44.490178	21.632081	20 Avg 2015	Đuknić J.
MH513637	<i>S. balcanicum</i>	Lutka	Sava	SLO	45.884078	15.640831	3 Sep 2015	Đuknić J.
MH587358	<i>S. balcanicum</i>	Lutka	Semani	ALB	40.750170	19.579350	26 Nov 2016	Csányi B.
MH549561	<i>S. balcanicum</i>	Lutka	Sava	HRV	45.759639	16.047861	4 Sep 2015	Đuknić J.
MH587359	<i>S. balcanicum</i>	Lutka	Despotovica	SRB	43.975009	20.419295	10 Avg 2016	Đuknić J.
MH587360	<i>S. balcanicum</i>	Lutka	Marica	BUG	41.926976	25.933149	23 Sep 2017	Đuknić J.
MH638296	<i>S. balcanicum</i>	Larva	Semani	ALB	40.750170	19.579350	26 Nov 2016	Csányi B.
MH587356	<i>S. balcanicum</i>	Larva	Sava	SLO	45.884078	15.640831	3 Sep 2015	Đuknić J.
MH587361	<i>S. balcanicum</i>	Lutka	Povelčić	BIH	45.076826	17.491039	5 Okt 2017	Đuknić J.
MH638295	<i>S. balcanicum</i>	Lutka	Isomotinis	GRČ	41.052367	25.618511	23 Sep 2017	Đuknić J.
MH549566	<i>S. turgaicum</i> 2	Larva	Una	BIH	45.051033	16.379216	4 Okt 2017	Đuknić J.
MH549565	<i>S. turgaicum</i> 2	Lutka	Sava	SLO	45.884078	15.640831	3 Sep 2015	Đuknić J.
MH549562	<i>S. lineatum</i> 2	Larva	Sava	SLO	45.884078	15.640831	3 Sep 2015	Đuknić J.
MH549564	<i>S. lineatum</i> 2	Larva	Sava	HRV	45.759639	16.047861	4 Sep 2015	Đuknić J.
MH549563	<i>S. lineatum</i> 2	Lutka	Sava	HRV	45.759639	16.047861	4 Sep 2015	Đuknić J.
MH151331	<i>S. paraequinum</i> 1	Lutka	Morača	CRG	42.476927	19.304713	8 Avg 2016	Đuknić J.
MH002239	<i>S. paraequinum</i> 1	Lutka	Čemernica	SRB	43.909483	20.403543	10 Avg 2016	Đuknić J.
MH151332	<i>S. paraequinum</i> 1	Lutka	Lim	SRB	43.393293	19.642978	9 Avg 2016	Đuknić J.
MH215257	<i>S. paraequinum</i> 1	Larva	Morača	CRG	42.476927	19.304713	8 Avg 2016	Đuknić J.
MH549552	<i>S. equinum</i>	Lutka	Despotovica	SRB	43.975009	20.419295	10 Avg 2016	Đuknić J.
MH215258	<i>S. equinum</i>	Lutka	Lim	SRB	43.393293	19.642978	9 Avg 2016	Đuknić J.
MH549556	<i>S. equinum</i>	Larva	Čemernica	SRB	43.909483	20.403543	10 Avg 2016	Đuknić J.
MH549549	<i>S. equinum</i>	Lutka	Leva reka	MAK	41.142257	21.000276	22 Jun 2017	Đuknić J.
MH549553	<i>S. equinum</i>	Lutka	Dragovištica	SRB	42.427797	22.520684	7 Okt 2014	Đuknić J.
MH549551	<i>S. equinum</i>	Lutka	Čemernica	SRB	43.909483	20.403543	10 Avg 2016	Đuknić J.
MH549554	<i>S. equinum</i>	Lutka	Dragovištica	SRB	42.427797	22.520684	7 Okt 2014	Đuknić J.
MH549557	<i>S. equinum</i>	Lutka	Vrbas	BIH	44.624718	17.152975	5 Okt 2017	Đuknić J.
MH549548	<i>S. equinum</i>	Larva	Čemernica	SRB	43.909483	20.403543	10 Avg 2016	Đuknić J.
MH549550	<i>S. equinum</i>	Lutka	Struma	BUG	41.943417	23.097965	17 Sep 2017	Đuknić J.
MH549555	<i>S. equinum</i>	Lutka	Šemnica	MAK	41.065155	21.258429	23 Jun 2017	Đuknić J.
MH587348	<i>S. pseudequinum</i> B	Lutka	Isomotinis	GRČ	41.052367	25.618511	23 Sep 2017	Đuknić J.
MH549558	<i>S. pseudequinum</i> B	Lutka	Tara	CRG	42.863386	19.527027	8 Avg 2016	Đuknić J.
MH549559	<i>S. pseudequinum</i> B	Lutka	Vrbica	BUG	41.569597	25.391039	23 Sep 2017	Đuknić J.
MH587352	<i>S. pseudequinum</i> B	Lutka	Orahovica	HRV	45.550243	17.899489	25 Sep 2016	Đuknić J.
MH587351	<i>S. pseudequinum</i> B	Lutka	Despotovica	SRB	43.975009	20.419295	10 Avg 2016	Đuknić J.
MH549560	<i>S. pseudequinum</i> B	Larva	Despotovica	SRB	43.975009	20.419295	10 Avg 2016	Đuknić J.
MH587347	<i>S. pseudequinum</i> B	Larva	Orahovica	HRV	45.550243	17.899489	25 Sep 2016	Đuknić J.
MH587349	<i>S. pseudequinum</i> B	Larva	Chlomontas	GRČ	40.587002	23.485925	18 Sep 2017	Đuknić J.
MH587350	<i>S. pseudequinum</i> B	Larva	Vrbica	BUG	41.569597	25.391039	23 Sep 2017	Đuknić J.
MK936587	<i>S. reptans</i>	Lutka	Sava	SLO	45.884078	15.640831	03 Sep 2015	Đuknić J.

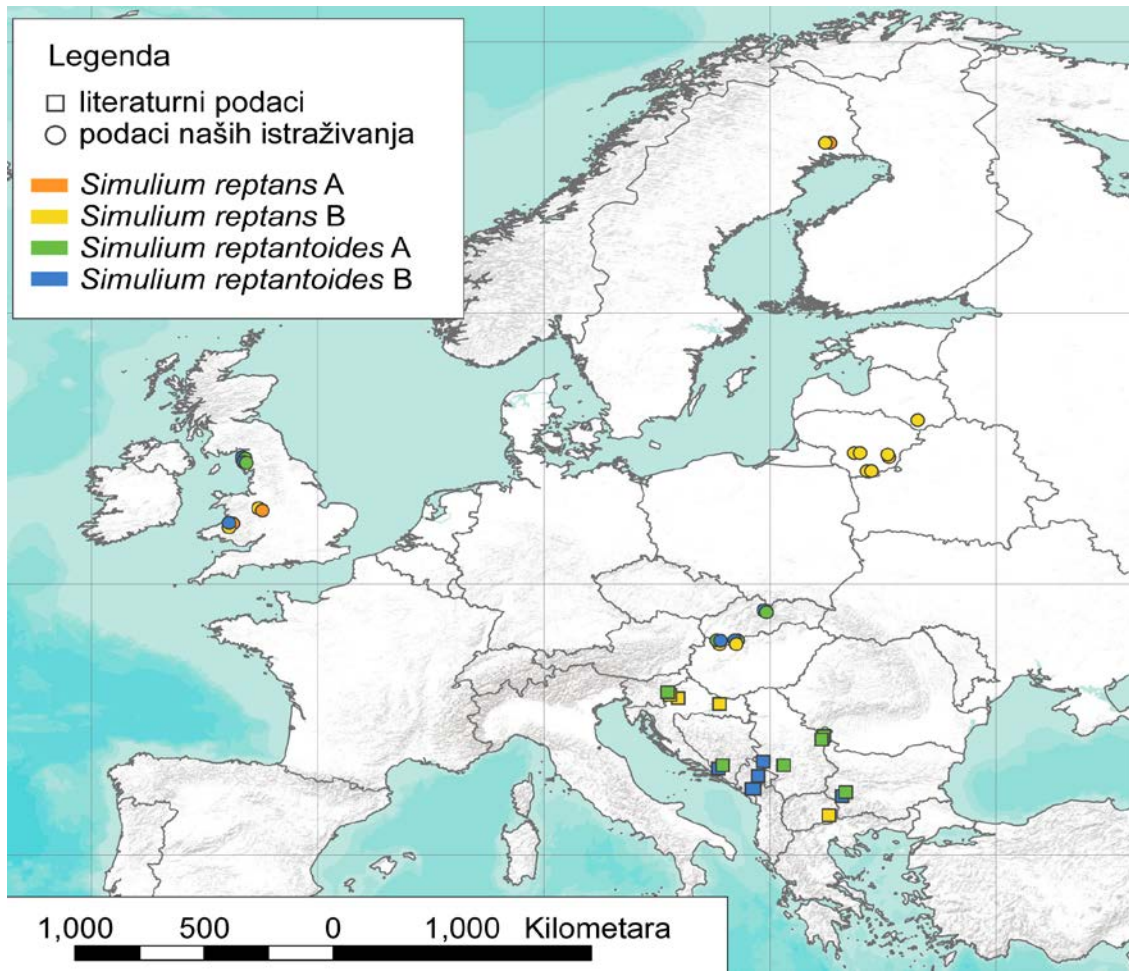
MATERIJAL I METODE

Nastaval **tabele 2.**

Broj sekvence	Klada (potencijalna vrsta)	Sta.	Reka	Drž.	Geo. širina	Geo. dužina	Datum sakupljanja	Kolektor
MK936590	<i>S. reptans</i>	Lutka	Sava	SLO	45.884078	15.640831	03 Sep 2015	Đuknić J.
MK936588	<i>S. reptans</i>	Lutka	Sava	HRV	45.759639	16.047861	04 Sep 2015	Đuknić J.
MK936589	<i>S. reptans</i>	Lutka	Humljani	HRV	45.578080	17.798738	25 Sep 2016	Đuknić J.
MK947040	<i>S. reptans</i>	Lutka	Strumica	MAK	41.497500	22.643333	24 Jun 2017	Đuknić J.
MK936596	<i>S. reptantoides</i>	Larva	Sava	SLO	45.884078	15.640831	03 Sep 2015	Đuknić J.
MK947041	<i>S. reptantoides</i>	Lutka	Neretva	BIH	43.149052	17.737837	31 Jul 2016	Đuknić J.
MK936595	<i>S. reptantoides</i>	Larva	Zamna	SRB	44.297883	22.354969	26 Apr 2015	Đuknić J.
MK947046	<i>S. reptantoides</i>	Lutka	Urovisa	SRB	44.399425	22.407786	25 Apr 2015	Đuknić J.
MK947048	<i>S. reptantoides</i>	Lutka	Urovisa	SRB	44.399425	22.407786	25 Apr 2015	Đuknić J.
MK947045	<i>S. reptantoides</i>	Lutka	Ibar	SRB	43.286957	20.618514	11 Jun 2017	Đuknić J.
MK947047	<i>S. reptantoides</i>	Lutka	Ibar	SRB	43.286957	20.618514	11 Jun 2017	Đuknić J.
MK936591	<i>S. reptantoides</i>	Lutka	Rila	BUG	42.131866	23.156651	17 Sep 2017	Đuknić J.
MK947044	<i>S. reptantoides</i>	Larva	Neretva	BIH	43.149052	17.737837	31 Jul 2016	Đuknić J.
MK947043	<i>S. reptantoides</i>	Lutka	Neretva	BIH	43.149052	17.737837	31 Jul 2016	Đuknić J.
MK946294	<i>S. reptantoides</i>	Lutka	Tara	CRN	42.863386	19.527027	08 Avg 2017	Đuknić J.
MK947042	<i>S. reptantoides</i>	Lutka	Cijevna	CRN	42.382999	19.278886	25 Mar 2017	Đuknić J.
MK940493	<i>S. reptantoides</i>	Lutka	Lim	SRB	43.393293	19.642978	09 Avg 2016	Đuknić J.
MK937592	<i>S. reptantoides</i>	Lutka	Rila	BUG	42.131866	23.156651	17 Sep 2017	Đuknić J.

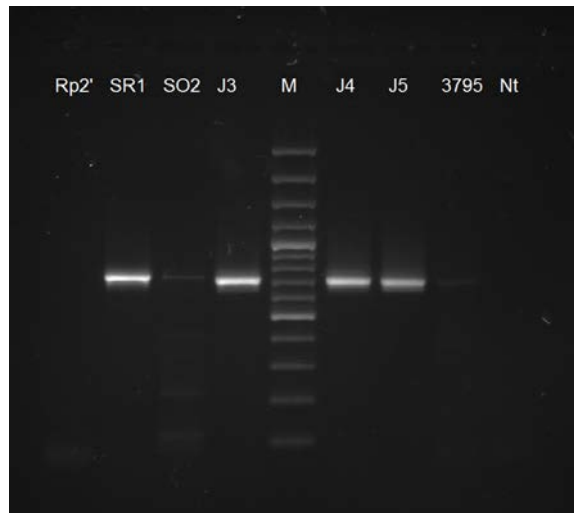


Slika 13. Lokaliteti sa kojih su sakupljene jedinke podroda *Wilhelmia* sa Balkanskog poluostrva iz kojih je izolovana mtDNK i lokaliteti porekla za preuzete sekvence iz baza GenBank i BOLD.



Slika 14. Mapa lokaliteta prikupljenih primeraka *S. reptans* i *S. reptantoides* sa Balkanskog poluostrva (naša istraživanja) i lokaliteta porekla preuzetih sekvenci iz NCBI GenBank.

Barkoding region mtCOI gena je amplifikovan korišćenjem sledećih oligonukleotidnih prajmera: LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') i HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGCTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer i sar., 1994). Amplifikacija je urađena u zapremini od 25 μ l. Reakciona smeša je sadržala: 1 μ l izolovane DNK, 16,9 μ l dH₂O, 0,5 μ l dNTPs, 0,5 μ l GoTaq pufera, po 0,7 μ l LCO i HCO prajmera i 0,2 μ l GoTaq polimeraze. PCR ciklusi su odrađeni u 2720 Thermal Cycler-mašini (Applied Biosystems). Temperaturni uslovi reakcije su bili: 2 minuta inicijalne denaturacije na 95°C, zatim 35 ciklusa denaturacije na 94°C u trajanju od 1 min, vezivanja prajmera na 50°C tokom 1 min i ekstenzije na 72°C u trajanju od 1 min, nakon kojih je usledila finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 5 min. Etidijum bromid je korišćen za vizuelizaciju PCR proizvoda na 1% agaroznom gelu pod UV transiluminatorom (Slika 15). Uspešno izolovani produkti reakcije čuvani su na 4°C.



Slika 15. Provera kvaliteta dobijenih amplificiranih produkata DNK. Uspešna izolacija i amplifikacija uočava se za uzorke SR1, J3, J4 i J5.

Sekvenciranje DNK je urađeno u Centru za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Za proveru i sređivanje sekvenci korišćen je ABI Sequence Scanner Software verzija 2.0 (Applied Biosystems). Sirove sekvence su pregledane i sa krajeva su „odsečeni“ delovi koji su bili lošeg kvaliteta. Sve dobijene DNK sekvence su uskladištene u banci podataka GenBank a pristupni brojevi su prikazani u tabeli 2.

3.3.2. Genetička analiza

Dva različita seta podataka korišćena su pri genetičkim i filogenetskim analizama. Jedan set je korišćen za ispitivanje diverziteta i rasprostranjenosti podroda *Wilhelmia* na Balkanu, kao i za utvrđivanje položaja jedinki sa Balkana u filogeografskom okviru čitavog podroda. Drugi set je upotrebljen da se popuni jaz u znanju o rasprostranjenosti i genetičkoj varijabilnosti vrsta *S. reptans* i *S. reptantoides* u jugoistočnoj Evropi, odnosno da se utvrdi da li su ove vrste prisutne na Balkanu ili ne, te ukoliko jesu, koje su prethodno prepoznate molekularne forme (haplogrupe) zastupljene.

Za potrebe ispitivanja diverziteta i rasprostranjenosti podroda *Wilhelmia* na Balkanu analizirano je ukupno 226 sekvenci. Kako larve simulida mogu biti komplikovane za identifikaciju, korišćen je BLAST (eng. *Basic Local Alignment Tool*) algoritam u cilju pronalaženja slične sekvence u bazi podataka GenBank koja sadrži između ostalog i neidentifikovane ili pogrešno identifikovane vrste simulida. Dve dobijene sekvence (sa pristupnim brojevima MF458827 i MF458826) bile su slične našim sekvencama *S. pseudequinum*, pa su uključene u analizu. Sekvence koje potiču od vrsta *Simulium* (*Simulium*) *jenningsi* grupe bile su više od 90% identične podrodu *Wilhelmia* u BLAST algoritmima, pa smo koristili jednu od vrsta ove grupe, *S. notiale* Stone & Snoddy, 1969, kao tzv. autgrupu (eng. *outgroup*) za podrod *Wilhelmia*. Ukupan uzorak je činilo 47 sekvenci vrsta podroda *Wilhelmia* prikupljenih sa Balkanskog poluostrva, 47 sekvenci *Wilhelmia* preuzetih iz BOLD baze (eng. *The Barcode of Life Data Sistem* - BOLD Sistem, <http://www.boldsystems.org/>, Ratnasingham i Hebert, 2007) i 124 sekvence vrsta podroda *Wilhelmia* iz baze GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Pored toga, preuzeto je i 8 sekvenci iz GenBank baze podataka koje su korišćene kao autgrup taksoni: 4 sekvence *Simulium notiale* (Stone i Snoddy, 1969), 2 *Culicoides anophelis* (Edwards, 1922) i 2 *Thaumalea testacea* (Ruthe, 1831). Na osnovu ovih grupa koje bi trebalo da ukorene stablo rađen je „molekulski sat“, odnosno određeno je evolutivno vreme odvajanja taksona. Sekvence preuzete iz baza BOLD i GenBank su navedene u prilogu – Prilog 2. Analizirane jedinke poreklom su sa područja Velike Britanije, Francuske, Španije, Nemačke,

Litvanije, Ukrajine, Finske, Turske, Jermenije, Pakistana kao i Balkana (Slovenije, Hrvatske, Srbije, Crne Gore, Bugarske, Makedonije, Grčke i Albanije). Mapa lokaliteta sa kojih su dobijene sekvence vrsta iz podroda *Wilhelmia* prikazana je na slici 13.

Za potrebe ispitivanja diverziteta i rasprostranjenosti vrsta *Simulium reptans* i *S. reptantoides* na Balkanu analizirano je 90 sekvenci: pet sekvenci *S. reptans* i 14 *S. reptantoides* prikupljenih sa Balkanskog poluostrva, 38 sekvenci *S. reptans* i 33 *S. reptantoides* preuzetih iz baze GenBank i šest sekvenci iz GenBank baze podataka koje su korišćene kao autgrupe: dve *Simulium vernum* Macquart, 1826, dve *Thaumalea testacea* Ruthe, 1831 i dve *Culicoides brevitarsis* Kieffer. Sekvence mtCOI gena za *S. reptans* i *S. reptantoides* koje su preuzete sa GenBank-a potiču iz Slovačke (19 sekvenci), Litvanije (8), Letonije (3), Švedske (12) i UK (29), a navedene su u prilogu – Prilog 3.

Sve sekvence mtCOI korišćene za analizu preuzete su u FASTA formatu i poravnate su (eng. *multiple alignment*) koristeći ClustalW algoritam, prema već zadatim parametrima, unutar programa MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0; Tamura i sar., 2013).

Za testiranje modela supstitucije nukleotida koji najviše odgovara ulaznim podacima metodom maksimalne verodostojnosti (ML) takođe je korišćen MEGA6 program. Model sa najnižim Bajesovim informacionim kriterijumom BIC (eng. *Bayesian Information Criterion - BIC*) predstavljao bi model koji najbolje opisuje obrazac supstitucija za dati set podataka. Kao najadekvatniji model određen je T92+ Γ model (Tamurin tro-parametarski model uz gama distribuciju stope variranja između nukleotidnih pozicija). Ovaj model je zatim korišćen u daljim analizama.

Filogenetske analize maksimalne verodostojnosti (eng. *Maximum Likelihood - ML*) i maksimalne parsimonije (eng. *Maximum parsimony - MP*) takođe su urađene korišćenjem MEGA6 programa sa podešavanjem genetičkog koda za mitohondrijalnu DNK beskičmenjaka, dok su Bajesove filogenetske analize izvršene korišćenjem BEAST v2.4.2 (Bouckaert i sar., 2014).

Kako bi se procenila podrška grana na ML i MP stablima urađena je analiza podrške butstrap metodom ponovnog slučajnog uzorkovanja sa zamenom (eng. *bootstrap*) (Holmes, 2003). To je statistička metoda koja se često koristi za procenu reproducibilnosti specifičnih karakteristika filogenetskih stabala, odnosno njome procenjujemo pouzdanost pretpostavljenih veza. U ovom slučaju konsenzus stablo (butstrap konsenzus stablo) dobijeno je na osnovu 1000 iteracija (mogućih stabala), a brojevi pored grana (u svakom čvorištu) predstavljaju procentualne vrednosti podrške ponavljanja grananja (grupisanja). Da bi se u programu MEGA6 izračunale prosečne genetičke udaljenosti između sekvenci unutar svake klade i između klada, primenjen je najbolji model supstitucije (1000 iteracija).

Za rekonstrukciju filogenetskih odnosa korišćeno je i Bajesovo zaključivanje (eng. *Bayesian Inference*) u programskom paketu BEAST v2.4.2 (Bouckaert i sar., 2014). Najprikladniji prethodni model evolucije u okviru BEAST-a izabran je u skladu sa izborom modela u MEGA6. Preliminarne analize tipa molekuskog sata sastojale su se od dve nezavisne serije, svaka sa 6.000.000 iteracija i sa uzorkovanjem na svakih 1.000 iteracija. Dobijeni histogrami posteriorne gustine analizirani su u programu TRACER v1.6 (Rambaut i sar., 2014) i zaključeno je da model striktnog molekuskog sata najviše odgovara za analizu podataka. Koristeći odabrane modele evolucije sekvenci i molekuskog sata rekonstruisano je stablo gena (odnosno, filogenija grupe). Bajesova filogenetska analiza je nezavisno obavljena dva puta (u dve serije) sa po 10 miliona iteracija i uzorkovanjem na svakih 1000 iteracija. I ovi rezultati su analizirani u programu TRACER v1.6, da bi se procenila konvergencija lanca i efektivna veličina uzorka (ESS). U svim slučajevima, 10% rekonstruisanih stabla bilo je odbačeno kao *burn-in*. Program LogCombiner v1.8.2. (Rambaut i Drummond, 2015) korišćen je da se kombinuju dve serije filogenetske rekonstrukcije u jedno finalno stablo (Drummond i sar., 2012).

Pored filogenetskih odnosa, za vrste roda *Wilhelmia* Bajesovom statistikom analizirano je i vreme razdvajanja klada (specijacije). Pošto za kalibraciju starosti čvorova unutar stabla podroda *Wilhelmia* nisu bili dostupni fosilni ostaci, korišćene su procene Bertone i sar. (2008) za dva MRCA (eng. *Most Recent Common Ancestor*) čvora: MRCA za Ceratopogonidae i

Simuliidae+Thaumaleidae unutar Culicomorpha, i MRCA1 za razdvajanje Thaumaleidae i Simuliidae. Za ove monofiletske čvorove, primenili smo log-normalne priore sa srednjim vrednostima od pre 226 i 130 miliona godina (Ma), respektivno. Datirani su važni događaji grananja u evolucionoj istoriji podroda *Wilhelmia* i upoređene su sa odgovarajućim paleogeografskim mapama (Kazmin i Natapov, 1998) kako bi se opisali događaji kladogeneze i specijacije.

Evoluciono značajna mesta u filogenetskom stablu dobijena su GMIC metodom (eng. *Generalized Mixed Yule Coalescent*) (Pons i sar., 2006; Fujisava i Barraclough, 2013). Pokazalo se da je ovaj metod robustan za razgraničenje vrsta kada se koriste podaci o jednom lokusu (Fujisava i Barraclough, 2013). Zatim su rezultati GMIC analize upoređeni sa morfološkom identifikacijom uzoraka i zaključeno je da se pronađene vrednosti molekulske diverzifikacije odnose na klade, a ne na (do sada prepoznate) vrste.

Softverski paket DnaSP v6.10.01 (Rozas i sar., 2017) korišćen je za analizu nukleotidne raznovrsnosti i testove neutralnosti za svaku kladu (potencijalnu vrstu) ograničenu GMIC analizom. Dobijeni su sledeći parametri: broj korišćenih sekvenci (n), broj haplotipova (h), broj mesta segregacije (S), haplotipska raznovrsnost (Hd) sa standardnom devijacijom, nukleotidna raznovrsnost (Pi) sa standardnom devijacijom, Tajimina D statistika i Fuova Fs statistika. Statistički značajne negativne vrednosti ova dva testa su pokazatelji da su populacije u prošlosti prošle kroz fazu ekspanzije (Tajima, 1989; Fu, 1997).

Promene u veličini populacije dobijene su u programu DnaSP v6.10.01 (eng. *mismatch distribution tests*). Mreže haplotipova za vrste podroda *Wilhelmia*, kao i za vrste *S. reptans* i *S. reptantoides* prepoznatih u DnaSP-u su konstruisane u programu Network v5.0.0.1. (Librado i Rozas, 2009). Da bi se smanjio broj čvorova u mrežama, sprovedena je tzv. kontrakcija zvezda haplotipova (Forster i sar., 2001). Nakon toga je za izračunavanje mreže korišćen algoritam spajanja medijana (Bandelt i sar., 1999).

3.4. Statističke analize

S obzirom na to, da je kod značajnog broja vrsta familije Simuliidae uočena izražena morfološka sličnost među vrstama koja se ogleda u velikom broju sestrinskih vrsta, kao i činjenice, da su vrste često pogrešno identifikovane, ekološke analize su urađene na dva seta podataka. Prvi set predstavljaju sve morfološki identifikovane vrste, dok drugi set čine grupe taksona (grupe vrsta, podrodovi i rodovi) kao više taksonomske kategorije. Analizom grupa taksona gubi se preciznost vezana za ekologiju vrste ali se izbegava potencijalna greška identifikacije. Korišćeni statistički paketi dati su u poglavljima 3.4.1., 3.4.2. i 3.4.3.

3.4.1. Analiza distribucije najčešćih vrsta simulida i njihova ekološka diferencijacija

Frekvencija pojavljivanja vrsta simulida određena je prema kategorijama nadmorskih visina, tipu vodotoka, slivu i hidroekoregionu kome lokaliteti pripadaju.

Za analizu ekološke diferenciranosti vrsta i grupa taksona u odnosu na nadmorsku visinu i tip vodotoka, korišćena je logistička Gausova regresija (ter Braak, 1986; Coudun i Gégout, 2006., James i sar., 2013). Kao rezultat dobija se regresiona kriva koja predstavlja odgovor vrste na variranje određenog sredinskog faktora.

Analize frekvencija pojavljivanja vrsta simulida kao i njihove ekološke diferenciranosti urađene su u programskom paketu FLORA (Karadžić, 2013).

3.4.2. Analize zajednica simulida u različitim tipovima staništa

Multivarijatna analiza varijanse (eng. *multivariate analysis of variance* - MANOVA) je upotrebljena kako bi se odredila kombinacija vrsta ili grupa taksona simulida koja maksimalno karakteriše (diskriminiše) različite tipove staništa (Bray i Maxwell, 1985). Za potrebe ove analize korišćeni su tipovi staništa klasifikovani prema: kategorijama nadmorskih visina, tipu vodotoka, slivu i hidroekoregionu kojima pripadaju (poglavlje 3.2.).

Analiza odnosa različitih tipova staništa i vrsta ili grupa taksona simulida urađena je u programskom paketu FLORA (Karadžić, 2013).

3.4.3. Analize biološkog diverziteta simulida u različitim tipovima staništa

Analiza biološkog diverziteta urađena je pomoću indeksa *alfa* i *beta* diverziteta korišćenjem programskog paketa FLORA (Karadžić, 2013).

Alfa diverzitet predstavlja raznovrsnost zajednice unutar staništa, a definisan je kako brojem vrsta, tako i njihovom ujednačenošću. Prema tome, zajednice okarakterisane visokim *alfa* diverzitetom karakteriše ujednačenost broja vrsta, dok je *alfa* diverzitet niži u zajednicama u kojima jedna vrsta dominira, makar i broj vrsta unutar zajednice bio visok. Za određivanje *alfa* diverziteta korišćeni su: Šenonov indeks, ekvitalnost (ujednačenost brojnosti) i bogatstvo vrsta.

Šenonov indeks (Shannon's index) izračunat je prema sledećoj jednačini:

$$H = -\sum_{i=1}^s p_i \log p_i$$

Gde je p_i udeo vrste i na određenom lokalitetu, s -ukupan broj vrsta na lokalitetu.

Ujednačenost ili ekvitalnost (engl. *equitability*) brojnosti vrsta izračunata je prema sledećoj jednačini:

$$E = H / H_{\max} = -\sum_{i=1}^s p_i \log p_i / \log s$$

gde je H_{\max} najveća moguća entropija, jednaka sa $\log(s)$. U slučajevima kada je samo jedna vrsta prisutna u uzorku ekvitalnost je neodređena (0/0). Kako bi se ovo izbeglo, za izračunavanje ekvitalnosti korišćena je modifikovana jednačina:

$$E = -\sum_{i=1}^s p_i \log p_i / \log(s + 0.01).$$

Bogatstvo vrsta (eng. *species richness*) predstavlja ukupan broj vrsta zabeležen na lokalitetu ili grupi lokaliteta.

Beta diverzitet predstavlja raznovrsnost između dve zajednice ili raznovrsnost zajednica duž geografskog gradijenta. Za njegovo izračunavanje korišćen je Žakardov koeficijent različitosti (Jaccard, 1912), koji se izračunava prema sledećoj jednačini:

$$\beta_J = (b+c) / (a+b+c)$$

MATERIJAL I METODE

gde je broj vrsta koje se nalaze u obe zajednice označen sa a , dok b predstavlja broj vrsta koji se nalaze samo u prvoj zajednici, a c je broj vrsta zabeležen samo u drugoj zajednici

$$\beta_j = 2\min(b,c)/(a+b+c) + |b-c|/(a+b+c)$$

Ova jednačina ukazuje da ukupni *beta* diverzitet (diverzitet između staništa) obuhvata dve aditivne komponente koje je opisuju: zamenu vrsta i bogatstvo vrsta.

Zamena vrsta (eng. *species turnover*) predstavlja prvu komponentu *beta* diverziteta:

$$ST=2\min(b,c)/(a+b+c),$$

dok razlika u bogatstvu vrsta između dve zajednice predstavlja drugu komponentu *beta* diverziteta:

$$SR=|b-c|/(a+b+c)$$

Ovu razliku u bogatstvu vrsta Baselga (2010) i Podani i sar. (2013) su označili terminom ugnježđenost (eng. *nestedness*). Kada je zamena vrsta jednaka nuli, ukupni diverzitet je rezultat razlike u bogatstvu vrsta. Tada je siromašnija zajednica podskup bogatije zajednice. Analiza *beta* diverziteta urađena je prema metodi koju je dao Baselga (2010).

REZULTATI

4.1. Tipološka analiza ispitivanog područja

Prisustvo simulida zabeleženo je u vodotocima koji otiču u četiri morska sliva. Najveći broj lokaliteta (163) nalazi se na rekama koje otiču u Crno more, što predstavlja 63,7% svih istraživanih lokaliteta. Crnomorskom slivu pripadaju lokaliteti na Dunavu, Savi, Kolubari, Velikoj Moravi, Mlavi, Peku, Uni, Sani, Vrbasu, Plivi, Ugaru, Vrbanji, Bosni, Drini, Sutjesci, Bistrici, Janju, Čehotini, Limu, Rzavu, Jadru, Južnoj Moravi, Jablanici, Pustoj Reci, Nišavi, Sokobanjskoj Moravici, Zapadnoj Moravi, Ibru i Rasini, kao i lokaliteti na njihovim manjim pritokama. Jadranskom slivu pripada 28 lokaliteta (10,9%), koji se nalaze na rekama Neretvi, Trešnjici, Zeti, Rijeci Crnojevića, Morači, Bojani/Buni i Drimu/Drinu, Kiru, Devoliu, Semeni, Gnjanici, Levoj Reci, Radici i Sateskoj Reci. Egejskom slivu pripada 58 lokaliteta, odnosno 22,7% istraživanih lokaliteta na rekama Vardaru, Pčinji, Crnoj Reci, Bregalnici, Strumi, Dragovištici, Rili, Strumici, Marici, Mestu/Nestosu, Peneju/Pineios i drugim manjim rekama. Samo 7 lokaliteta pripada Jonskom slivu (svega 2,7% istraživanih lokaliteta) i to na rekama Nedontas, Glafkos, Peiros, Veliniatika, Erateini i Eurotas. Spisak svih lokaliteta prikazan je u tabeli u prilogu (Prilog 1).

Lokaliteti sa kojih su prikupljene simulide pripadaju i različitim hidroekoregionima. Tako se unutar ER4 (Alpi) nalazi pet lokaliteta u Sloveniji (četiri na izvorišnom delu reke Save i jedan na Blejskom Vintgardu). Hidroekoregionu ER5 (Dinarski Zapadni Balkan) pripada najveći broj istraživanih lokaliteta (180), odnosno 70,3%. Ovaj hidroekoregion obuhvata veći deo Slovenije, Hrvatske, Srbije, Bosnu i Hercegovinu, Crnu Goru. Unutar ER6 (Grčki Zapadni Balkan) nalazi se 36 lokaliteta (14,1%). Obuhvata teritoriju Albanije, Zapadnog dela Makedonije (do Vardara) i centralne i južne Grčke. Unutar ER7 (Istočni Balkan) nalazi se 52 lokaliteta (20,3%). Njemu pripadaju lokaliteti na teritoriji Bugarske, delu Makedonije zapadno od Vardara i zapadnom delu Grčke. Hidroekoregionu ER10 (Karpati) pripada osam lokaliteta koji se nalaze na malim pritokama Dunava u istočnoj Srbiji (reke: Blederija, Urovica, Vratna, Zamna i Porečka reka). Hidroekoregionu ER11 (Mađarska ravnica) pripada 16 lokaliteta (6,25%). To su lokaliteti na pritokama Kolubare (Pocibravi, Jablanici, Tamnavi, Peštanu, Beljanici, Barajevskoj reci, Marici), Drine (Čadavici i Štiri), Save (Baričkoj reci i Kolubari), Dunava (Savi i Velikoj Moravi).

Ukoliko se posmatra tip vodotoka, najmanji udeo istraživanih lokaliteta (1,6%) pripada tipu T1, velikim ravničarskim rekama sa finim supstratom (lokaliteti na Dunavu, Savi i donjem toku Velike Morave). Tipu T2 (velikim i srednjim rekama sa krupnim supstratom) pripada 62 lokaliteta, odnosno 24,2%. Osim lokaliteta na Limu, Tari, Zeti i Nišavi ovom tipu pripadaju lokaliteti na nadmorskim visinama ispod 500 m. Najveći udeo istraživanih lokaliteta (52,7%) pripada tipu T3 (malim rekama sa krupnim supstratom), čak 135 lokaliteta. Tipu T4 (izvorišni regioni reka i potoci) pripada 21,5% istraživanih lokaliteta (55), sa ujednačenom distribucijom po nadmorskim visinama.

Lokalitet na najnižoj nadmorskoj visini nalazi se na reci Drim u Albaniji na svega 1 m iznad nivoa mora, dok je lokalitet na najvišoj nadmorskoj visini (1437 m) na Samokovskoj reci, na planini Kopaonik u Srbiji. Prosečna nadmorska visina istraživanog područja iznosila je 418 m. Ukoliko se posmatraju kategorije nadmorskih visina, najveći procentualni udeo istraživanih lokaliteta (62,5%) pripada kategoriji NV1 (nadmorske visine od 0–500 m), kategoriji NV2 (500–800 m) pripada 21,5% istraživanih lokaliteta, dok 16% pripada kategoriji NV3 (preko 800 m).

4.2. Faunistički sastav familije Simuliidae na ispitivanom području

U periodu od 2013. do 2021. godine na ispitivanom području zabeleženo je ukupno 46 taksona iz familije Simuliidae čija je identifikacija izvršena na osnovu morfoloških karaktera. Do nivoa vrste determinisan je 41 takson. Jedan takson identifikovan je do nivoa grupe vrsta (*Simulium*

REZULTATI

variegatum grupa), a četiri taksona do nivoa podroda (*Prosimulium* sp., *Eusimulium* sp., *Nevermannia* sp. i *Wilhelmia* sp.). Spisak identifikovanih taksona prikazana je u tabeli 3.

Zabeleženi taksoni svrstani su u tri roda: *Prosimulium*, *Metacnephia* i *Simulium*. U okviru roda *Prosimulium* nađene su tri vrste: *P. hirtipes* (Fries, 1824), *P. rufipes* (Meigen, 1830) i *P. tomosvaryi* (Enderlein, 1921). U okviru roda *Metacnephia* zabeležena je samo jedna vrsta *M. blanci* (Grenier & Theodorides, 1953). Najveći broj vrsta (37) konstatovan je u okviru roda *Simulium*, koje se svrstavaju u šest podrodova *Byssodon*, *Boophthora*, *Eusimulium*, *Nevermannia*, *Simulium*, *Wilhelmia* i *Trichodagmia* (tabela 3).

Tabela 3. Spisak taksona identifikovanih na osnovu morfoloških karaktera.

rod <i>Prosimulium</i>	skraćena
HIRTIPES grupa vrsta	
<i>Prosimulium hirtipes</i> (Fries, 1824)	P. hir
<i>Prosimulium rufipes</i> (Meigen, 1830)	P. fuf
<i>Prosimulium tomosvaryi</i> (Enderlein, 1921)	P. tom
<i>Prosimulium</i> sp. juv	
rod <i>Metacnephia</i>	
<i>Metacnephia blanci</i> (Grenier & Theodorides, 1953)	M. bla
rod <i>Simulium</i>	
podrod <i>Byssodon</i>	
MERIDIONALE grupa vrsta	
<i>Simulium (Byssodon) maculatum</i> (Meigen, 1804)	S. mac
podrod <i>Boophthora</i>	
<i>Simulium (Boophthora) erythrocephalum</i> (De Geer, 1776)	S. ery
podrod <i>Eusimulium</i>	
<i>Simulium (Eusimulium) angustipes</i> Edwards, 1915	S. ang1
<i>Simulium aureum</i> Fries, 1825	S. aur1
<i>Simulium (Eusimulium) cf. S. petricolum</i> (Rivosecchi, 1963)	S. pet
<i>Simulium (Eusimulium) rubzovianum</i> (Sherban, 1961)	S. rub
<i>Simulium (Eusimulium) sp. juv.</i>	
Podrod <i>Nevermannia</i>	
RUFICORNE grupa vrsta	
<i>Simulium (Nevermannia) angustitarse</i> (Lundström, 1911)	S. ang2
<i>Simulium (Nevermannia) lundstromi</i> (Enderlein, 1921)	S. lun
VERNUM grupa vrsta	
<i>Simulium (Nevermannia) brevidens</i> (Rubtsov, 1956)	S. bre
<i>Simulium (Nevermannia) costatum</i> Friederichs, 1920	S. cos
<i>Simulium (Nevermannia) cryophilum</i> (Rubtsov, 1959)	S. cry
<i>Simulium (Nevermannia) vernum</i> Macquart, 1826	S. ver
<i>Simulium (Nevermannia) sp.</i>	
Podrod <i>Simulium</i>	
ARGENTEOSTRIATUM grupa vrsta	
<i>Simulium (Simulium) argenteostriatum</i> Strobl, 1898	S. arg1
BEZZII grupa vrsta	
<i>Simulium (Simulium) bezzii</i> (Corti, 1914)	S. bez

REZULTATI

Nastavak **Tabele 3.**

BUKOVSKII grupa vrsta

Simulium (Simulium) degrangei Dorier & Grenier, 1960 S. deg

NOELLERI grupa vrsta

Simulium (Simulium) cf. S. noelleri Friederichs, 1920 S. noe

ORNATUM grupa vrsta

Simulium (Simulium) ornatum Meigen, 1818 S. orn

Simulium (Simulium) intermedinum Roubaud, 1906 S. int

Simulium (Simulium) trifasciatum Curtis, 1839 S. tri

REPTANS grupa vrsta

Simulium (Simulium) reptans (Linnaeus, 1758) S. rep1

Simulium (Simulium) reptantoides Carlsson, 1962 S. rep2

TUBEROSUM grupa vrsta

Simulium (Simulium) tuberosum (Lundstrom, 1911) S. tub

Simulium (Simulium) vulgare Dorogostaisky, Rubtsov & Vlasenko, 1935 S. vul

VARIEGATUM grupa vrsta

Simulium (Simulium) argyreatum Meigen, 1838 S. arg2

Simulium (Simulium) maximum (Knoz, 1961) S. max

Simulium (Simulium) monticola Friederichs, 1921 S. mon

Simulium (Simulium) variegatum group S. var1

Simulium (Simulium) variegatum Meigen, 1818 S. var2

Simulium (Simulium) cf. S. xanthinum Edwards, 1933 S. xan

VENUSTUM grupa vrsta

Simulium (Simulium) morsitans Edwards, 1915 S. mor

Simulium (Simulium) paramorsitans Rubtsov, 1956 S. par1

ALBELLUM grupa vrsta

Simulium (Trichodagmia) auricoma S. aur2

podrod *Wilhelmia*

EQUINUM grupa vrsta

Simulium (Wilhelmia) sp.

Simulium (Wilhelmia) balcanicum (Enderlein, 1924) S. bal

Simulium (Wilhelmia) equinum (Linnaeus, 1758) S. equ

Simulium (Wilhelmia) lineatum (Meigen, 1804) S. lin

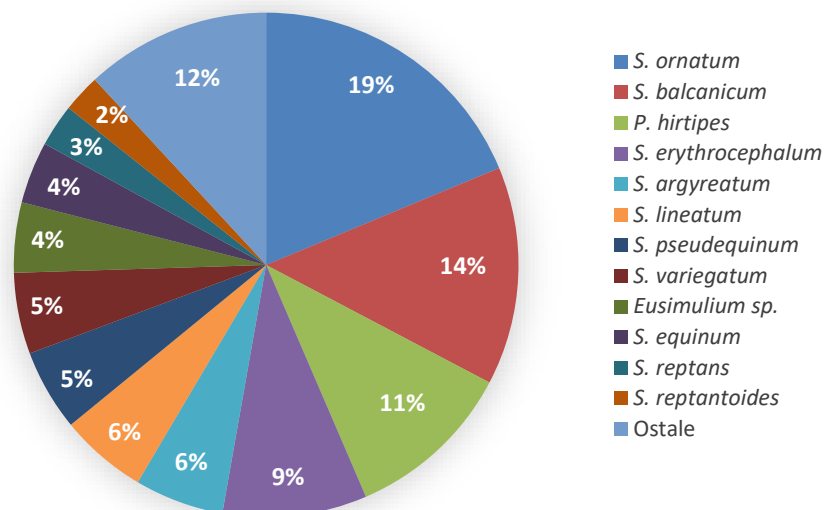
Simulium (Wilhelmia) paraequinum Puri, 1933 S. par2

Simulium (Wilhelmia) pseudequinum Séguy, 1921 S. pse

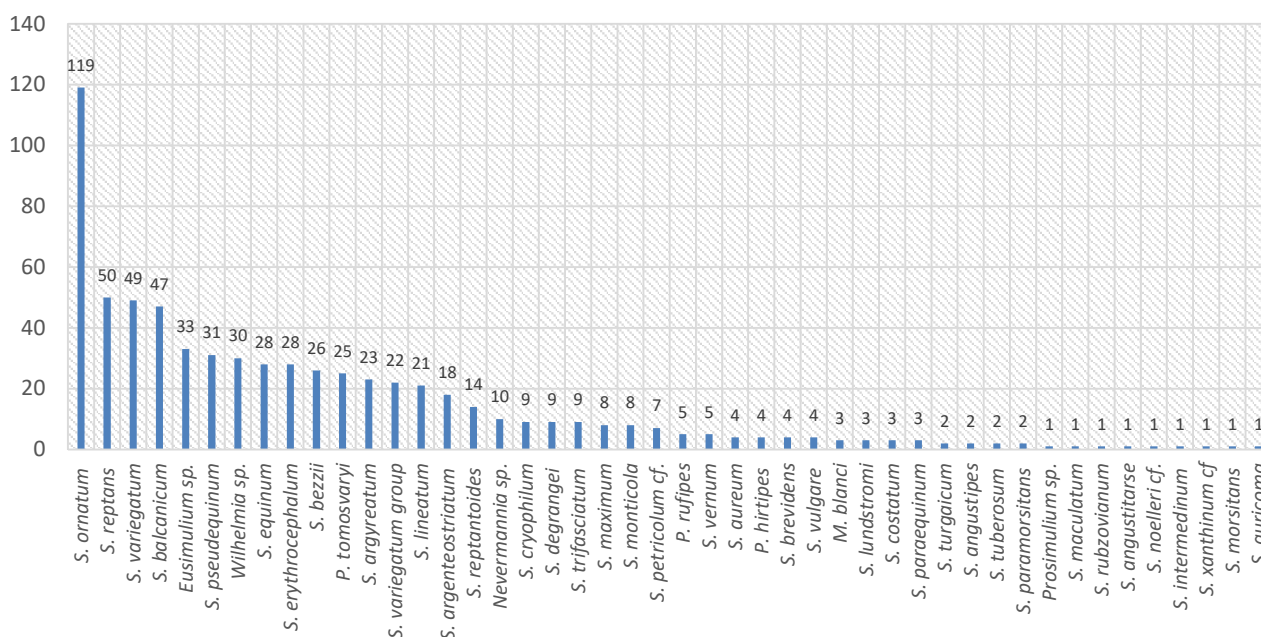
Simulium (Wilhelmia) turgaicum Rubtsov, 1940 S. tur

Sa ukupno 256 istraživanih lokaliteta prikupljeno je 40.747 larvi i lutaka simulida. Najčešće nalažena, a ujedno i jedinkama najbrojnija vrsta tokom ovog istraživanja bila je vrsta *Simulium ornatum* Meigen, 1818. Njeno prisustvo zabeleženo je na 119 lokaliteta (7.630 individua, 19% svih prikupljenih jedinki). Druge često nalažene vrste su *S. reptans* (50 lokaliteta), *S. variegatum* Meigen, 1818 (49 lokaliteta) i *S. balcanicum* (Enderlein, 1924) na 47 lokaliteta (slika 17). Procentualni udeo jedinki ovih vrsta prikazan je na slici 16. Ukoliko posmatramo ukupan broj zabeleženih jedinki, na drugom mestu je *S. balcanicum* sa ukupno 5.699 jedinki (14%), pa *P. hirtipes* (Fries, 1824) sa 4.409 (11%) i *S. erythrocephalum* (De Geer, 1776) sa 3.769 jedinki (9%) (Slika 16).

REZULTATI



Slika 16. Procentualna zastupljenost jedinki vrsta Simuliidae na proučavanim lokalitetima.



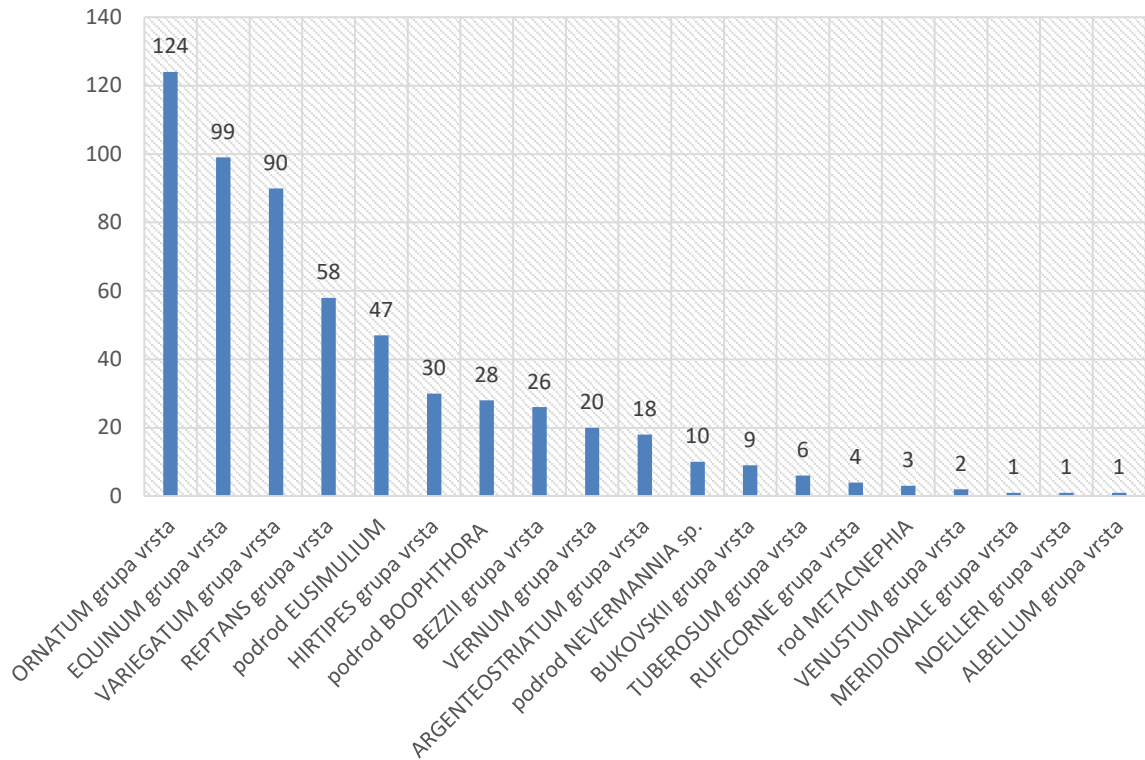
Slika 17. Broj lokaliteta na kojima su sakupljene jedinke određenog taksona.

Tokom ovih istraživanja, na po jednom lokalitetu zabeležene su vrste *S. morsitans*, *S. intermedium*, *S. angustitarse*, *S. maculatum* samo sa po jednom jedinkom, a vrste *S. rubzovianum* i *S. xanthinum* sa po dve jedinke, *S. noelleri* (8 jedinki) i *S. auricoma* (10 jedinki).

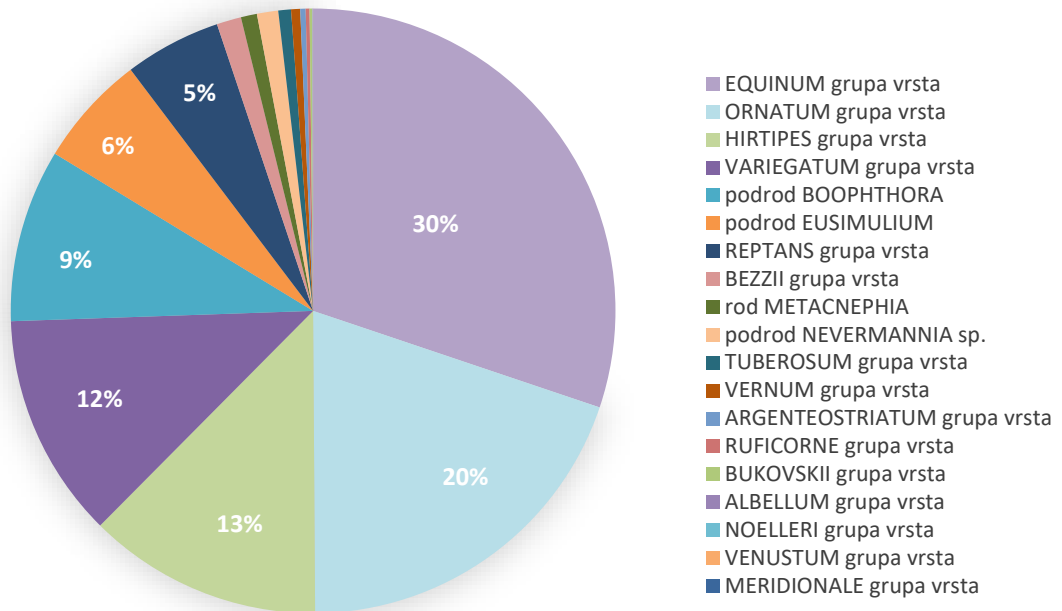
Ukoliko posmatramo grupe taksona, ORNATUM grupa vrsta zabeležena je na 124 lokaliteta, EQUINUM na 99 lokaliteta, VARIEGATUM na 90 lokaliteta, dok su predstavnici REPTANS grupe vrsta zabeleženi na 58 lokaliteta (Slika 18). Grupa taksona sa najvećim brojem prikupljenih jedinki (12 295) je EQUINUM grupa vrsta. Ona čini 30% svih prikupljenih simulida. Prati je

REZULTATI

ORNATUM sa 8036 jedinki (20%), HIRTIPES sa 5111 jedinki (13%) i VARIEGATUM sa 4897 (12%) jedinki (Slika 19).



Slika 18. Broj lokaliteta na kojima su sakupljene jedinke određene grupe taksona.



Slika 19. Procentualna zastupljenost grupa taksona Simuliidae na proučavanim lokalitetima. Imena grupa zastupljenih sa učestalošću manjom od 1% nisu prikazana u legendi slike.

4.3. Genetičke analize i filogenetski odnosi vrsta simulida

Genetičke analize i filogenetski odnosi vrsta simulida analizirani su na vrstama podroda *Wilhelmia*, kao i dvema vrstama REPTANS grupe vrsta – *Simulium reptans* i *S. reptantoides*.

4.3.1. Genetička varijabilnost i filogenetski odnosi podroda *Wilhelmia*

Filogenetski odnosi taksona iz podroda *Wilhelmia* analizirani su na osnovu 226 sekvenci (mtCOI) dužine od 638 bp do 713 bp. Rekonstrukcija odnosa izvršena je uzimajući u obzir Tamurin 3-parametarski model sa gama distribucijom varijacije između pozicija nukleotida (Tamura, 1992) koji je najbolje opisao obrazac supstitucije u sekvencama (Tabela 4).

Tabela 4. Pet modela supstitucije nukleotida koji najbolje odgovaraju ulaznim podacima. T92 – Tamurin 3-parametarski model (Tamura, 1992), GTR – Opšti model reverzibilnog vremena (Tavare, 1986), TN93 – Tamura-Nei model (Tamura i Nei, 1993). G – model sa gama distribuiranim evolucionim stopama među nukleotidnim pozicijama, I – model sa invarijantnim mestima, BIC – Bajesov informacijski kriterijum (Schwarz, 1978), lnL –logaritamska vrednost verodostojnosti.

Model	BIC	lnL
T92+ G +I	16449.48257	-5530.584276
T92+ G	16464.97209	-5544.276406
GTR+ G +I	16507.1061	-5523.711842
GTR+ G	16518.38881	-5535.300565
TN93+ G +I	16622.25964	-5599.130714

Topologija filogenetskog stabla podroda *Wilhelmia* sastojala se od 15 monofiletskih klada unutar podroda, što nije u potpunosti odgovaralo morfološkoj identifikaciji vrsta (Slika 20). GMIC analizom se takođe izdvojilo 15 vrsta. Ove potencijalne vrste identične su kladama na filogenetskom stablu (Slika 21). Nakon filogenetskih i GMIC analiza, odlučeno je da se poštuje monofilija svih pronađenih klada (potencijalnih vrsta), a na osnovu referenci su im pridodata odgovarajuća „imena“.

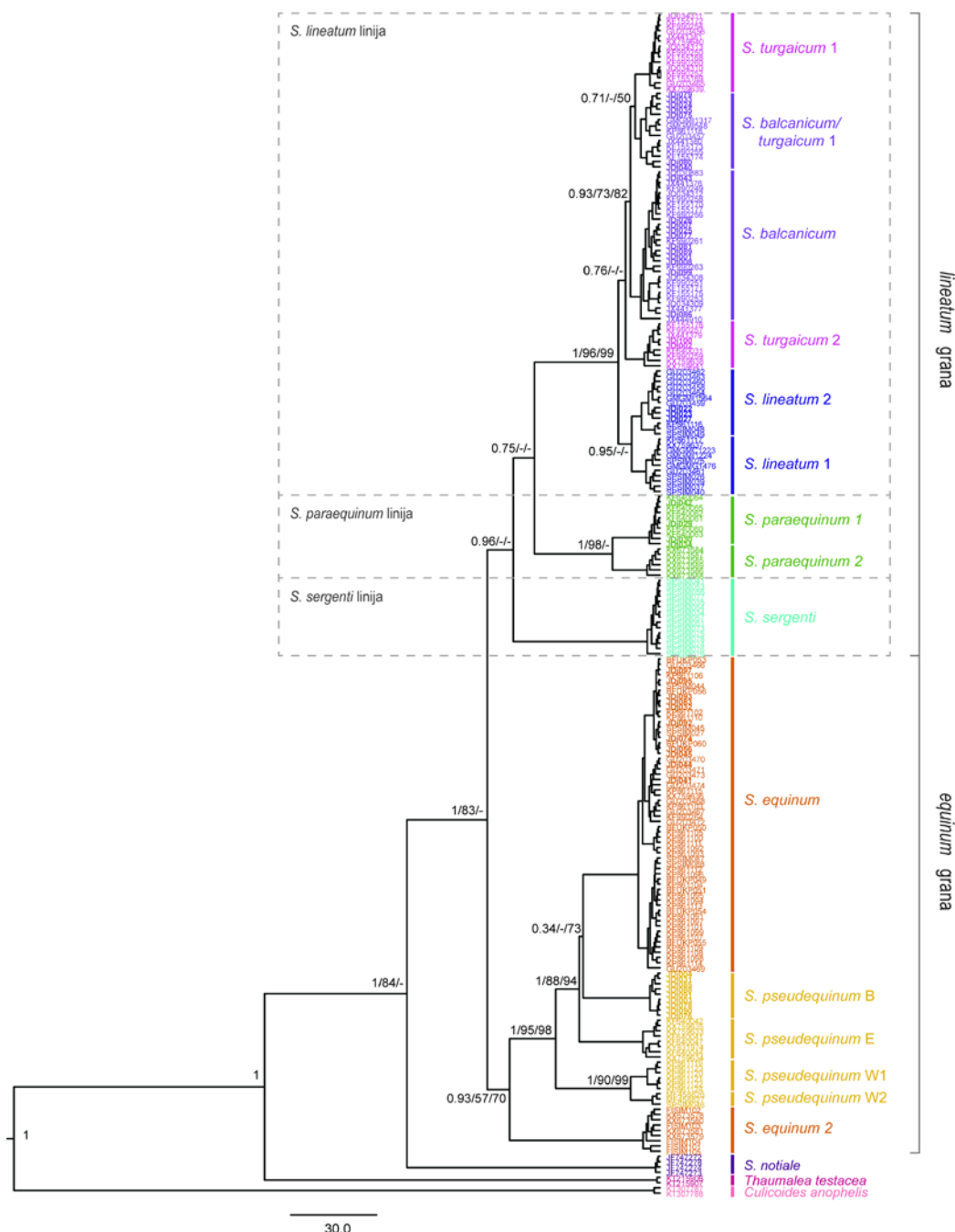
Morfološki definisane vrste bile su prisutne kao monofiletske samo u slučaju *Simulium sergenti*, *S. lineatum* i *S. paraequinum*, pri čemu su poslednje dve bile sastavljene od dve klade (slika 20). Sve ostale morfološki prepoznate vrste *Wilhelmia* se ne smatraju monofiletskim. Na primer, parafiletski *S. pseudequinum* je uključivao četiri klade, a polifiletski *S. equinum* je uključivao dve klade. Štaviše, pokazalo se da neke sekvence potiču od prvobitno pogrešno identifikovanih jedinki. Imena klada u stablu data su ili u saglasnosti sa prethodnim autorima (npr. Inci i sar. 2017) ili uslovno. Klade *S. pseudequinum* iz zapadne Evrope (Ujedinjeno Kraljevstvo, Francuska i Španija) nazvane su *S. pseudequinum* W1 i *S. pseudequinum* W2; sekvence sa Balkanskog poluostrva nazvane su *S. pseudequinum* B, a sekvence iz istočne Evrope i Azije (Jermenija, Turska i Pakistan) nazvane su *S. pseudequinum* E.

U okviru podroda *Wilhelmia* mogu se videti dve glavne visoko podržane (sa BI >0,90) monofiletske grane (Slika 20). Jednu granu čine klade *S. equinum*, *S. pseudequinum* B, *S. pseudequinum* E, *S. pseudequinum* W1, *S. pseudequinum* W2 i *S. equinum* 2. Drugu granu činile su linije *sergenti*, *paraequinum* i *lineatum*, međutim položaji linija *sergenti* i *paraequinum* varirali su u zavisnosti od metoda korišćenog za rekonstrukciju filogenije. Linija *lineatum* bila je veoma raznolika i obuhvatala je šest klada: *S. lineatum* 1, *S. lineatum* 2, *S. balcanicum*, *S. balcanicum/turgaicum* 1, *S. turgaicum* 1 i *S. turgaicum* 2. Klada *S. balcanicum/turgaicum* 1 sadržala je sekvence jedinki koje su morfološki identifikovane kao *S. balcanicum* - sve lutke su

REZULTATI

imale račvaste škrge (Slika 21) i sekvence jedinki (morfološki i kariološki) identifikovanih kao *S. turgaicum* (deo klade *S. turgaicum* 1 prema Inci i sar. 2017).

Uzorci sa Balkanskog poluostrva javljaju se u okviru sedam klada. Prethodna inventorna lista podroda *Wilhelmia* na Balkanu uključivala je *S. angustifurca*, *S. balcanicum*, *S. equinum*, *S. lineatum*, *S. paraequinum* i *S. pseudequinum* (Adler, 2022). Uzorci *S. angustifurca* nisu bili dostupni, pa nisu uključeni u ova istraživanja. Značajno je da molekularni rezultati ove studije pokazuju endemsku prirodu *S. pseudequinum* (klada *S. pseudequinum* B) i prisustvo *S. turgaicum* (klade *S. turgaicum* 2) na Balkanu.



Slika 20. Bajesovo filogenetsko stablo zasnovano na mtCOI genu jedinki podroda *Wilhelmia*, sa *S. notiale*, *Culicoides anopheles* i *Thaumalea testacea* kao autgrupama. Brojevi iznad/ispod grana predstavljaju posteriorne BA verovatnoće praćene ML i MP >50% podrške. Sekvence su date kao GenBank ili BOLD pristupni brojevi. Sekvence izolovane u ovoj studiji su podebljane. Boje klade date su prema morfološkoj identifikaciji. Traka pokazuje broj zamena. Modifikovano prema: Đuknić i sar. 2018.

REZULTATI



Slika 21. Škrge lutke *Simulium balcanicum/turgaicum* 1, taksonomski karakter: jasno vidljive petiolaste škrge. Identifikacioni brojevi: JDj080 (A, B), JDj079 (C, D), JDj075 (E), JDj0p33 (F). Škrge lutke (E) i (F) su slomljene i nedostaju im filamenti, ali se uočavaju glavni karakteri (fotografije: J. Đuknić).

Nukleotidna raznovrsnost unutar monofiletskih klada kretala se od 2,5% u okviru *S. paraequinum* 2, do 10,72% u okviru *S. equinum* 2 (Tabela 5). Mitohondrijalni COI gen je otkrio da je veći diverzitet haplotipova (1,000) bio unutar vrsta *S. paraequinum* 1, *S. pseudequinum* W2 i *S. equinum* 2, dok je najmanji (0,629) bio u okviru *S. turgaicum* 1. Najveći broj haplotipova (32) zabeležen je unutar vrste *S. equinum* (Tabela 5). Analiza *mismatch* distribucije klada prikazana je u prilogu 4. Grafikoni frekvencije parnih razlika između alela ukazuju na distribuciju multimodalne

REZULTATI

neusklađenosti. Negativne vrednosti Tadžiminog D i Fu-ovog Fs testa (uočene u većini klada) ukazuju na nisku nukleotidnu raznolikost, ali visoku haplotipsku raznolikost.

Tabela 5. Proračuni nukleotidne raznovrsnosti i testovi neutralnosti: n – broj sekvenci, h – broj haplotipova, S – broj mesta segregacije, Hd – raznovrsnost haplotipa±standardna devijacija, Pi – nukleotidna raznolikost ± standardna devijacija, Tajima's D – Tadžimin D test i Fu's Fs – Fu-ov Fs test

Klade	n	h	S	Hd	Pi	Tajima's D	Fu's Fs
<i>S. turgaicum</i> 1	15	5	4/555	0,629±0,125	0,00264±0,00052	0,61628	-0,571
<i>S. balcanicum/turgaicum</i> 1	15	12	20/547	0,962±0,040	0,00963±0,00105	-0,75871	-4,539
<i>S. balcanicum</i>	29	15	24/538	0,872±0,053	0,00783±0,00119	-1,21092	-4,569
<i>S. turgaicum</i> 2	9	6	13/612	0,889±0,091	0,00654±0,00136	-0,78119	-0,5
<i>S. lineatum</i> 2	13	8	10/531	0,859±0,089	0,00377±0,00075	-1,51552	-3,645
<i>S. lineatum</i> 1	11	8	11/552	0,891±0,092	0,00580±0,00096	-0,63656	-2,782
<i>S. paraequinum</i> 1	6	6	13/646	1,000±0,096	0,00846±0,00161	-0,24351	-1,987
<i>S. paraequinum</i> 2	10	5	5/525	0,756±0,130	0,00250±0,00068	-1,03527	-1,587
<i>S. sergenti</i>	15	7	10/658	0,781±0,102	0,00324±0,00088	-1,16596	-1,686
<i>S. equinum</i>	58	32	34/551	0,887±0,038	0,00717±0,00061	-1,62754	-24,298*
<i>S. pseudequinum</i> B	9	4	9/565	0,750±0,112	0,00531±0,00127	-0,43284	1,293
<i>S. pseudequinum</i> E	8	7	17/615	0,964±0,077	0,00952±0,00149	-0,55019	-1,547
<i>S. pseudequinum</i> W1	6	4	8/658	0,800±0,172	0,00638±0,00128	1,1717	0,851
<i>S. pseudequinum</i> W2	3	3	4/634	1,000±0,272	0,00421±0,00140	/	-0,341
<i>S. equinum</i> 2	9	9	23/632	1,000±0,052	0,01072±0,00146	-1,05159	-3,932

Napomena *, $p < 0.02$

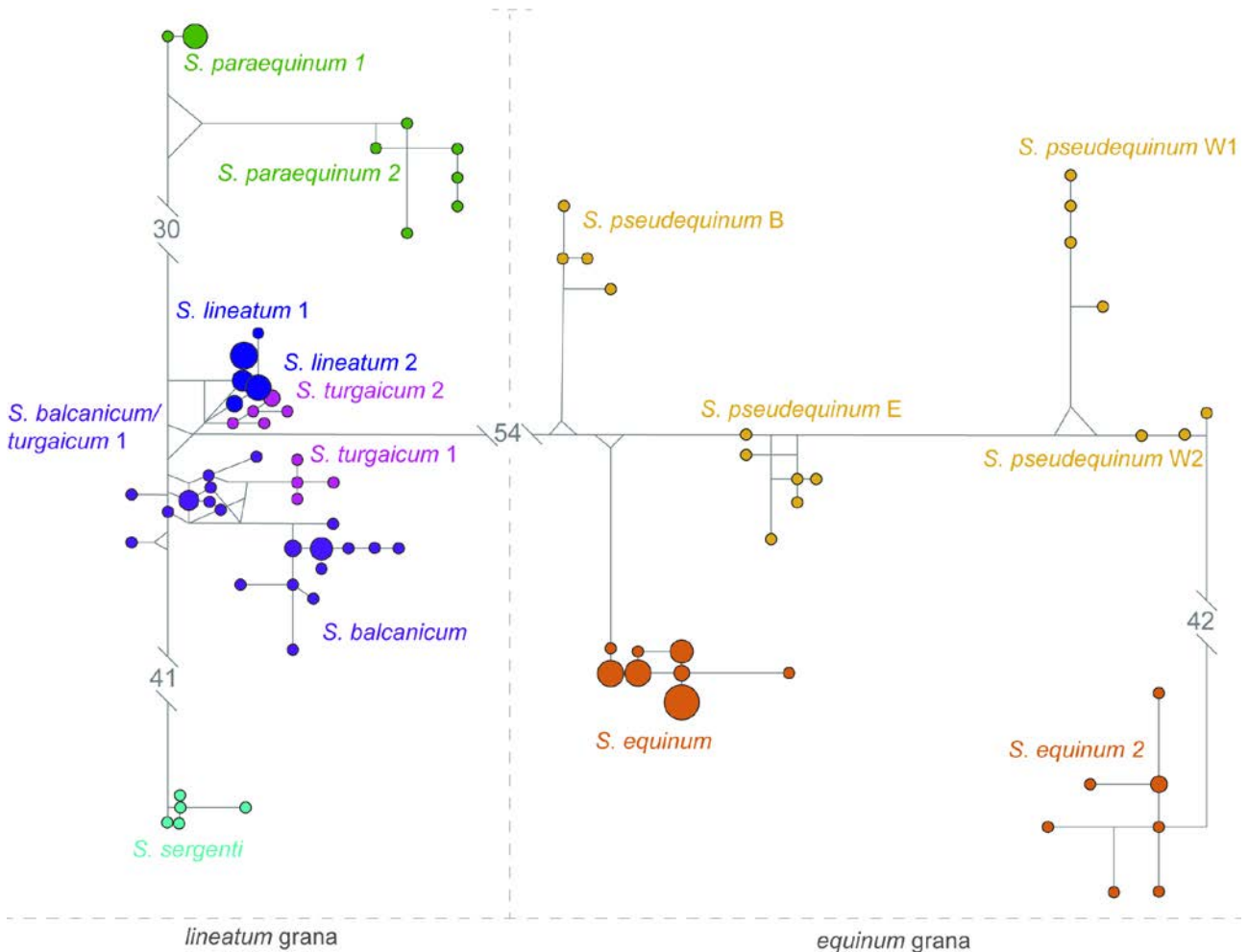
Divergencija među kladama za mtCOI sekvencu *Wilhelmia* kretala se od 1,78% (*S. lineatum* 1 naspram *S. lineatum* 2) do 18,93% (*S. equinum* 1 naspram *S. paraequinum* 1) (Tabela 6). Sve klade iz linije *lineatum* (*S. lineatum* 1, *S. lineatum* 2, *S. balcanicum*, *S. balcanicum/turgaicum* 1, *S. turgaicum* 1 i *S. turgaicum* 2) pokazale su niske genetičke udaljenosti jedna od druge (1,78-3,30%) (Tabela 6).

Tabela 6. Evoluciona divergencija između klada na osnovu parne analize mtCOI sekvenci izračunatih uzimajući u obzir Tamurin troparametarski model supstitucije u softveru MEGA 6 (Tamura et al., 2013).

Klade	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.
1. <i>Simulium turgaicum</i> 1														
2. <i>Simulium balcanicum/turgaicum</i> 1	0,0212													
3. <i>Simulium balcanicum</i>	0,0250	0,0204												
4. <i>Simulium turgaicum</i> 2	0,0308	0,0256	0,0288											
5. <i>Simulium lineatum</i> 2	0,0330	0,0271	0,0303	0,0254										
6. <i>Simulium lineatum</i> 1	0,0302	0,0275	0,0279	0,0262	0,0178									
7. <i>Simulium paraequinum</i> 1	0,1307	0,1338	0,1329	0,1313	0,1367	0,1284								
8. <i>Simulium paraequinum</i> 2	0,1142	0,1202	0,1216	0,1181	0,1159	0,1152	0,0510							
9. <i>Simulium sergenti</i>	0,1273	0,1268	0,1243	0,1241	0,1224	0,1212	0,1487	0,1293						
10. <i>Simulium equinum</i> 1	0,1624	0,1711	0,1668	0,1656	0,1509	0,1551	0,1893	0,1756	0,1613					
11. <i>Simulium pseudequinum</i> B	0,1554	0,1565	0,1512	0,1455	0,1492	0,1667	0,2031	0,1734	0,1552	0,0862				
12. <i>Simulium pseudequinum</i> E	0,1487	0,1486	0,1425	0,1459	0,1333	0,1350	0,1550	0,1550	0,1537	0,0842	0,0833			
13. <i>Simulium pseudequinum</i> W1	0,1490	0,1545	0,1505	0,1540	0,1481	0,1475	0,1783	0,1690	0,1345	0,0993	0,0993	0,0990		
14. <i>Simulium pseudequinum</i> W2	0,1355	0,1486	0,1518	0,1463	0,1413	0,1373	0,1741	0,1552	0,1360	0,0937	0,1071	0,0898	0,0259	
15. <i>Simulium equinum</i> 2	0,1364	0,1507	0,1482	0,1358	0,1406	0,1346	0,1618	0,1555	0,1610	0,1779	0,1572	0,1399	0,1404	0,1203

REZULTATI

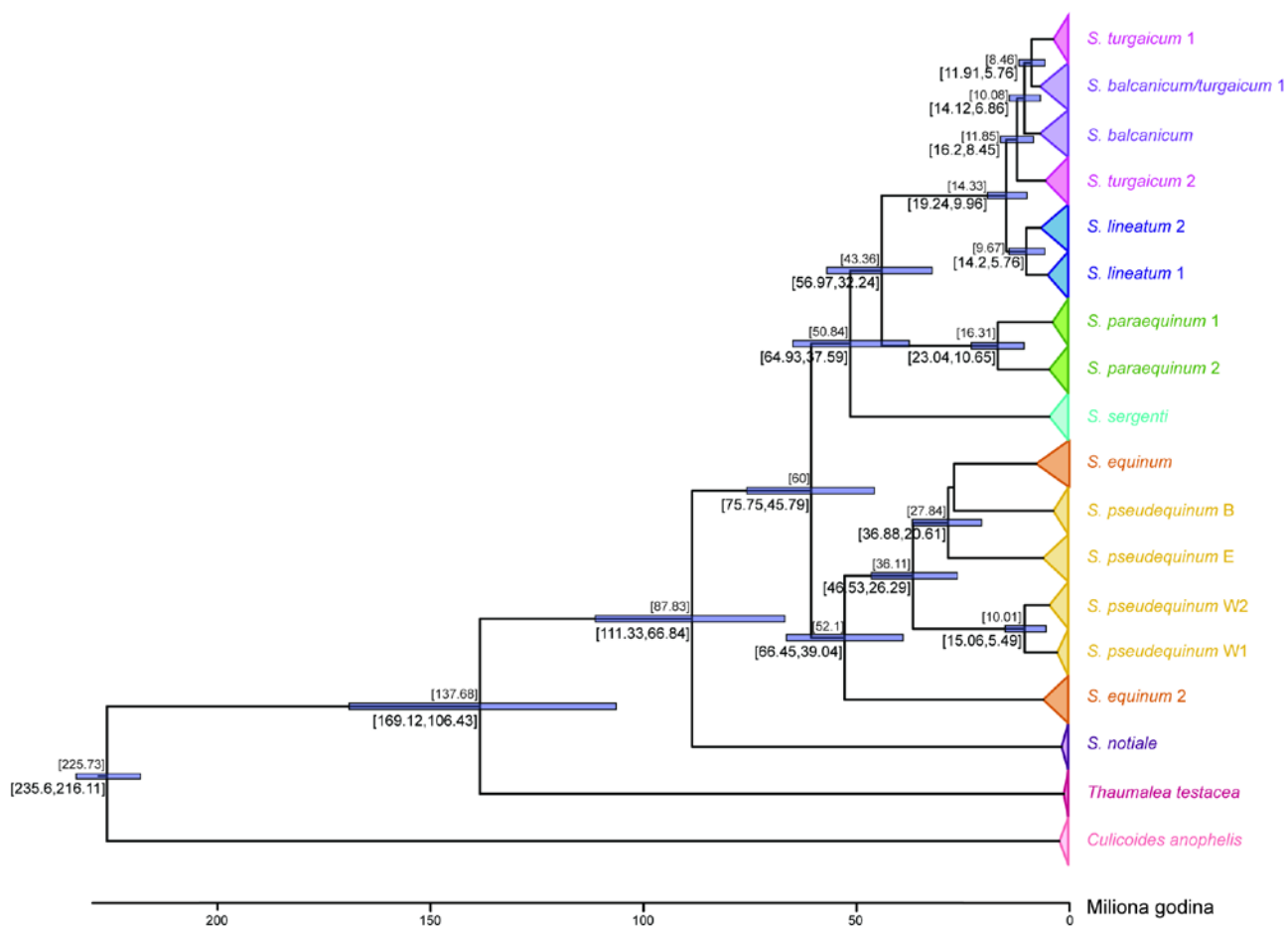
U programu DnaSP prepoznata su ukupno 122 haplotipa vrsta iz podroda *Wilhelmia* (Slika 22). Nakon primene metode kontrakcije zvezde haplotipova, broj haplotipova smanjen je na 80. Minimalni broj mutacija (5-7) zabeležen je među kladama *lineatum* linija, dok je maksimalni broj mutacija detektovan između *equinum* i *lineatum* grana (54), *S. equinum* 2 i ostalih klada iz *equinum*-grane (42), i između linija *sergenti* i *lineatum* (41).



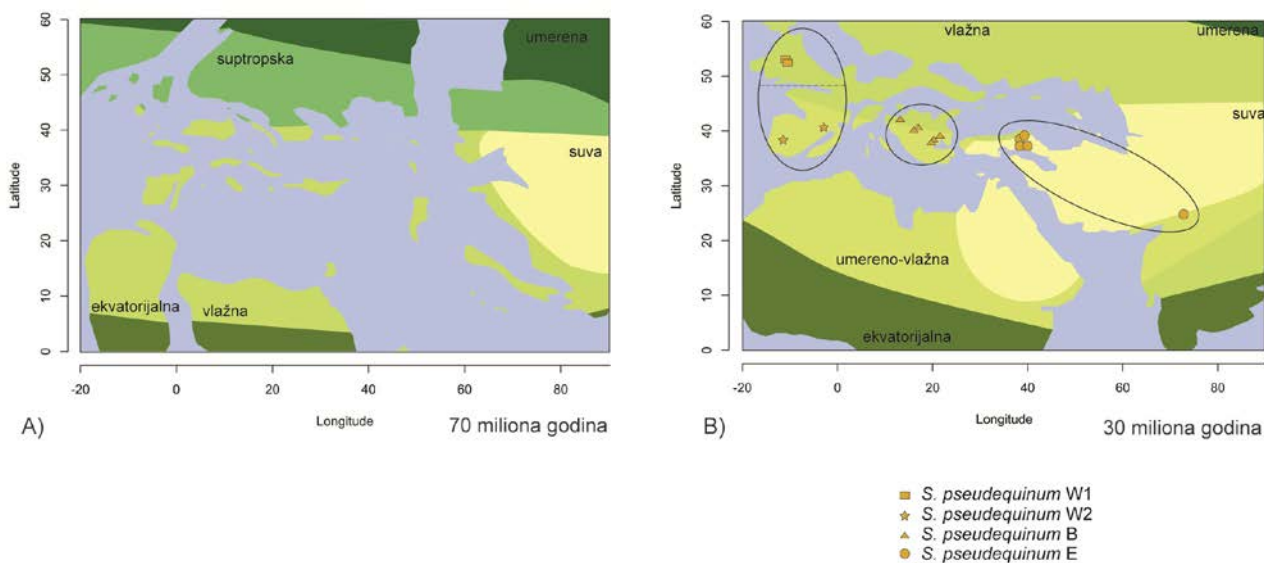
Slika 22. Mreža haplotipova gena mtCOI podroda *Wilhelmia* izrađena u programu Network (Librado i Rozas, 2009). Veličine krugova proporcionalne su frekvenciji haplotipa. Boje i nazivi klada odgovaraju filogenetskom stablu (Slika 20).

Prema analizama vremenskih događaja, evolucija podroda *Wilhelmia* započela je u kasnoj kredi (pre 111–67 miliona godina) (Slika 23). Prva diverzifikacija unutar podroda na dve grane započela je krajem krede i tokom paleocena (76–46 miliona godina) (Slika 23, Slika 24A). U to vreme, zapadni Palearktiki je karakterisala razučena obala koja se ogledala u velikom broju udaljenih ostrva u Tetisu (udaljenosti i do 1500 km), kao i niz klimatskih zona. To je omogućilo veliki potencijal za događaje alopatričke specijacije. Sa potencijalnih ostrva odakle su potekle, grane i linije vrsta mogle bi da šire svoju distribuciju na postepen način. Moguća alopatrička specijacija se takođe može posmatrati unutar grana. Prema rezultatima ove studije, kod morfološki ujednačenog *S. pseudequinum*, diverzifikacija među geografski udaljenim kladama dogodila se pre 46–21 miliona godina, tokom oligocena (Slika 24b).

REZULTATI



Slika 23. Datovano Bajesovo filogenetsko stablo zasnovano na mtCOI genu *Wilhelmia* klada, sa *Simulium notiale*, *Culicoides anopheles* i *Thaumalea testacea* kao autgrupama. Brojevi iznad grana predstavljaju srednju vrednost vremena za događaj grananja (udaljenost od sadašnjeg vremena), dok brojevi ispod grana predstavljaju opseg intervala poverenja vremena grananja.



Slika 24. Paleogeološke karte koje prikazuju lokaciju i okruženje klimu kopnenih masa (prema Kazmin i Natapov, 1998). A) Paleocen (~70 miliona godina), vreme prvog grananja unutar podroda *Wilhelmia* i B) Oligocen (~30 miliona godina), vreme diverzifikacije među *S. pseudequinum*.

4.3.2. Genetička varijabilnost i filogenetski odnosi vrsta *S. reptans* i *S. reptantoides*

Koristeći identifikacioni ključ Lechthaler i Car (2005) za morfološko-taksonomsku identifikaciju, sve prikupljene jedinke REPTANS grupe vrsta identifikovane su kao *S. reptans*. Međutim, genetičko barkodiranje ovih jedinki otkrilo je da su dve vrste (*S. reptans* i *S. reptantoides*) bile prisutne među identifikovanim materijalom. Identifikacija je zatim ponovljena korišćenjem ključeva Edwardsa (1920), Knoza (1965) i Dey i sar. (2008). Nakon ove revizije, morfološki su identifikovane obe vrste. U analiziranom materijalu sa svih 12 lokaliteta, *S. reptantoides* čini 73% primeraka, a morfološka i genetička identifikacija se poklapaju 100%.

Sve dobijene barkod-sekvence imale su dužine u rasponu od 453 bp do 606 bp. Tamura 3-parametarski model sa gama distribucijom varijacije između pozicija nukleotida (Tamura 1992) najbolje je modelovao sekvence uzoraka, pošto je imao najnižu BIC vrednost (Tabela 7).

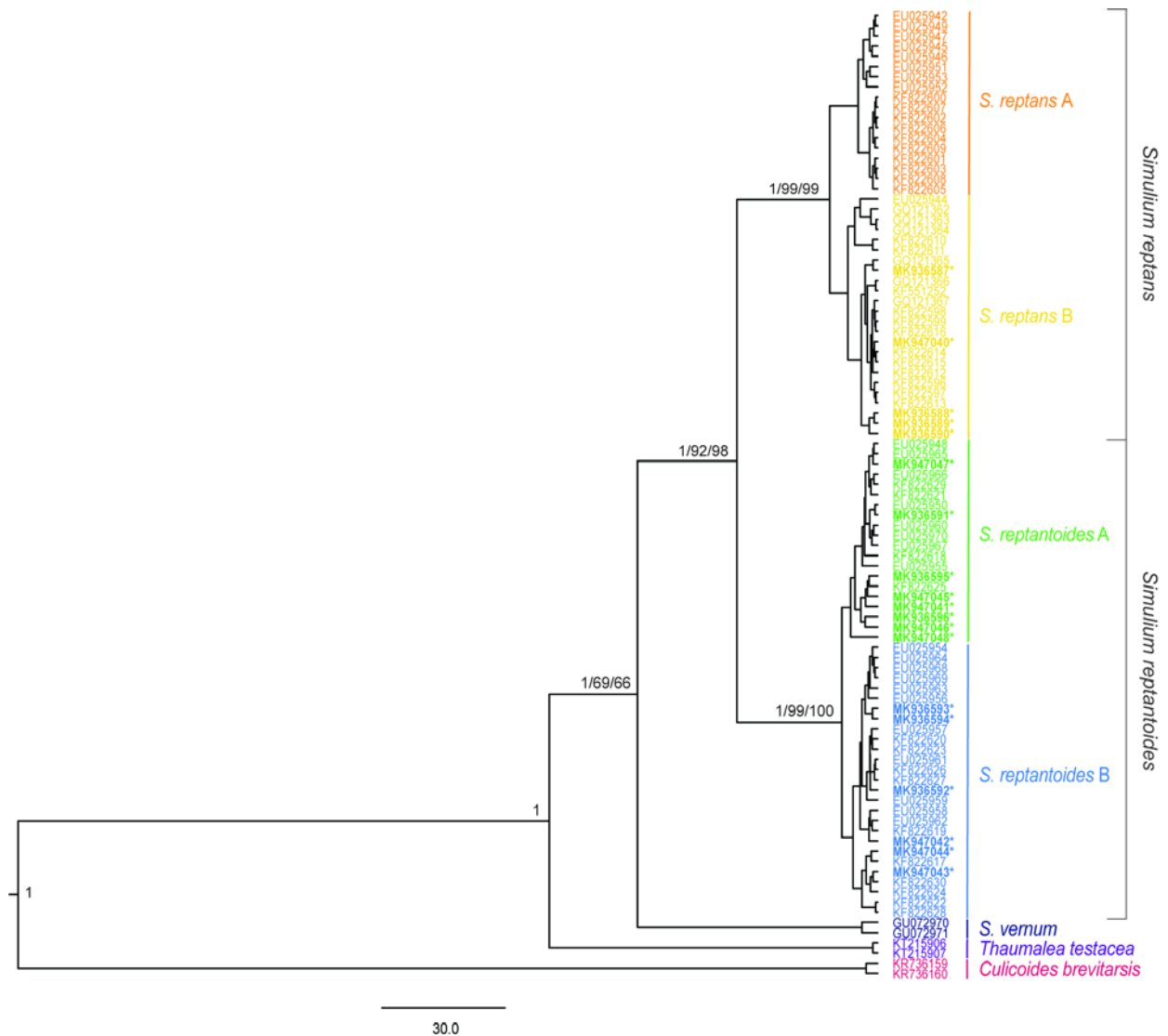
Tabela 7. Pet modela supstitucije nukleotida koji najbolje odgovaraju ulaznim podacima.

Model		BIC	lnL
T92+G	Tamura 3-parameter	7364,018442	-2643,969915
T92+G+I	Tamura 3-parameter	7372,132269	-2642,563464
HKY+G	Hasegawa-Kishino-Yano	7373,999596	-2638,033763
HKY+G+I	Hasegawa-Kishino-Yano	7381,914365	-2636,527782
TN93+G	Tamura-Nei	7384,845828	-2637,993514

Topologija filogenetskog stabla za *S. reptans* i *S. reptantoides* obuhvata 7 klada (Slika 25). Nazivi klada (A i B) dati su prema prethodnim studijama (Kudela i sar., 2014).

Bajesovo filogenetsko stablo (Slika 25) sastojalo se od dve visoko podržane grane (sa BI > 0,99) *S. reptans* i *S. reptantoides*. Jednu granu činile su klade *S. reptans* A i *S. reptans* B. Drugu granu činile su *S. reptantoides* A i *S. reptantoides* B. Uzorci sa Balkanskog poluostrva su se našli u tri klade: *S. reptans* B, *S. reptantoides* A i *S. reptantoides* B.

REZULTATI



Slika 25. Bajesovo filogenetsko stablo zasnovano na mtCOI genu dve vrste, *S. reptans* i *S. reptantoides*. Kao autgrupe korišćene su vrste *S. vernum*, *Culicoides brevitarsis* i *Thaumalea testacea*. Brojevi iznad grana predstavljaju posteriorne verovatnoće praćene ML i MP > 50% podrške. Sekvence su date kao pristupni brojevi iz baze GenBank. Sekvence dobijene tokom ove studije podebljane su sa zvezdicama na kraju pristupnog broja. Boje klade su date prema vrsti i formi.

Diverzitet nukleotida unutar monofiletskih klada kretao se od 0,50% u okviru *S. reptantoides* B do 0,70% u okviru *S. reptans* A (Tabela 8). Mitohondrijalni COI gen je posedovao veći diverzitet haplotipova (0,949) u okviru klade *S. reptantoides* B, dok je najmanji diverzitet (0,663) uočen kod *S. reptans* B. Najveći broj haplotipova (27) takođe je pronađen kod *S. reptantoides* B (Tabela 8). Negativne vrednosti Tadžiminog D i Fu-ovog Fs testa (uočene u svim kladama) ukazuju na nisku raznolikost nukleotida, ali visoku haplotipsku raznolikost.

REZULTATI

Tabela 8. Proračuni nukleotidne raznovrsnosti i testovi neutralnosti. n – broj sekvenci, h – broj haplotipova, S – broj mesta segregacije, Hd – raznovrsnost haplotipa ± standardna devijacija, Pi – nukleotidna raznolikost ± standardna devijacija, Tajima D test i Fu Fs test

Klade	n	h	S	Hd	Pi	Tajima's D	Fu's Fs
<i>S. reptans</i> A	18	9	20/453	0,797±0,090	0,00698±0,00252	-1,88682*	-1,912
<i>S. reptans</i> B	24	9	14/418	0,663±0,107	0,00667±0,00171	-1,07936	-1,485
<i>S. reptantoides</i> A	20	14	19/487	0,889±0,068	0,00631±0,00112	-1,72802	-8,315
<i>S. reptantoides</i> B	27	19	19/544	0,949±0,032	0,00500±0,00057	-1,79156	-16,054

Napomena: Statistička značajnost: *, p<0,05

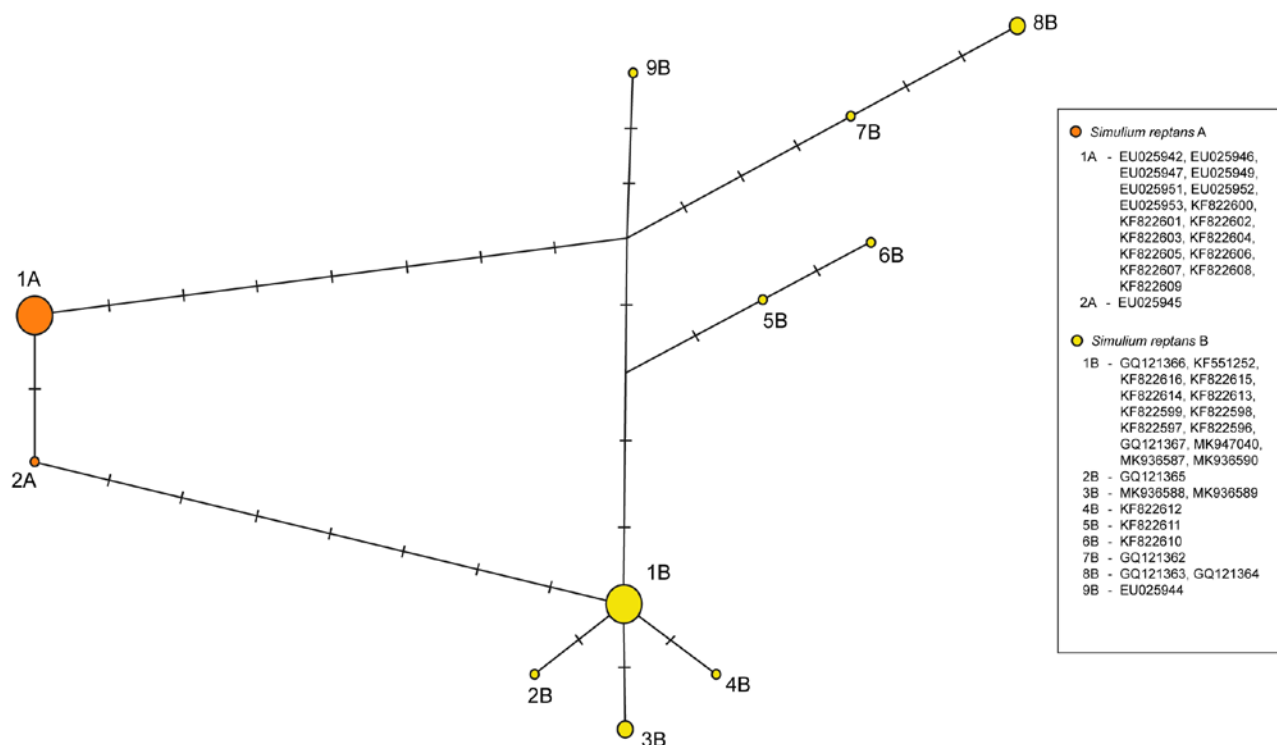
Divergencija među kladama za mtCOI sekvence *S. reptans* i *S. reptantoides* kretala se od 1,43% (*S. reptantoides* A naspram *S. reptantoides* B) do 7,94% (*S. reptans* A naspram *S. reptantoides* A) (Tabela 9). Klade unutar vrsta su pokazale genetičke udaljenosti koje su bile 2,31% za *S. reptans* i 1,43% za *S. reptantoides* (Tabela 9).

Tabela 9. Evoluciona divergencija između klada zasnovana na parnoj analizi mtCOI sekvenci

Klade	1.	2.	3.	4.
1. <i>Simulium reptans</i> A				
2. <i>Simulium reptans</i> B	0,0231			
3. <i>Simulium reptantoides</i> A	0,0794	0,0738		
4. <i>Simulium reptantoides</i> B	0,0775	0,0792	0,0143	

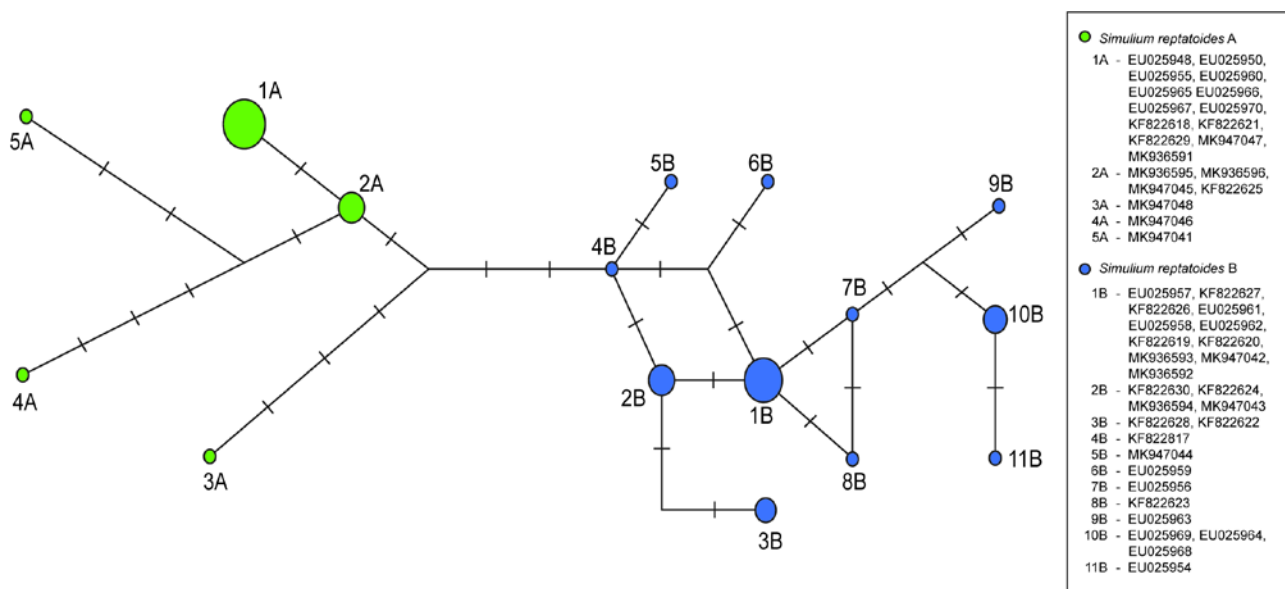
U DnaSP programskom paketu prepoznato je 18 haplotipova vrste *S. reptans* (Tabela 8). Nakon primene metode kontrakcije zvezde haplotipova, broj haplotipova je smanjen na 11. Minimalno rastojanje između haplotipova *S. reptans* A i *S. reptans* B bilo je sedam mutacionih događaja. Najmanji broj mutacija (samo jedna) zabeležen je između dva haplotipa klade *S. reptans* A. Sve sekvence su grupisane u jedan haplotip, osim sekvence EU025945. Najveći broj mutacija u kladi *S. reptans* B (devet) pronađen je između haplotipa 8B i haplotipova 2B, 3B i 4B (Slika 26).

REZULTATI



Slika 26. Mreža haplotipova dobijena od sekvenci gena mtCOI *S. reptans* korišćenjem programa Network (Librado & Rozas, 2009). Veličine krugova su proporcionalne frekvenciji haplotipa. Boje i nazivi klada odgovaraju filogenetskom stablu.

U DnaSP programu su prepoznata ukupno 33 haplotipa *S. reptantoides* (Tabela 8). Nakon primene metode kontrakcije zvezde haplotipova, broj haplotipova je smanjen na 16 (Slika 27). Minimalno rastojanje između haplotipova *S. reptantoides* A i *S. reptantoides* B bilo je tri mutacije. Klada *Simulium reptantoides* A ima pet različitih haplotipova dok klada *S. reptantoides* B ima 11.

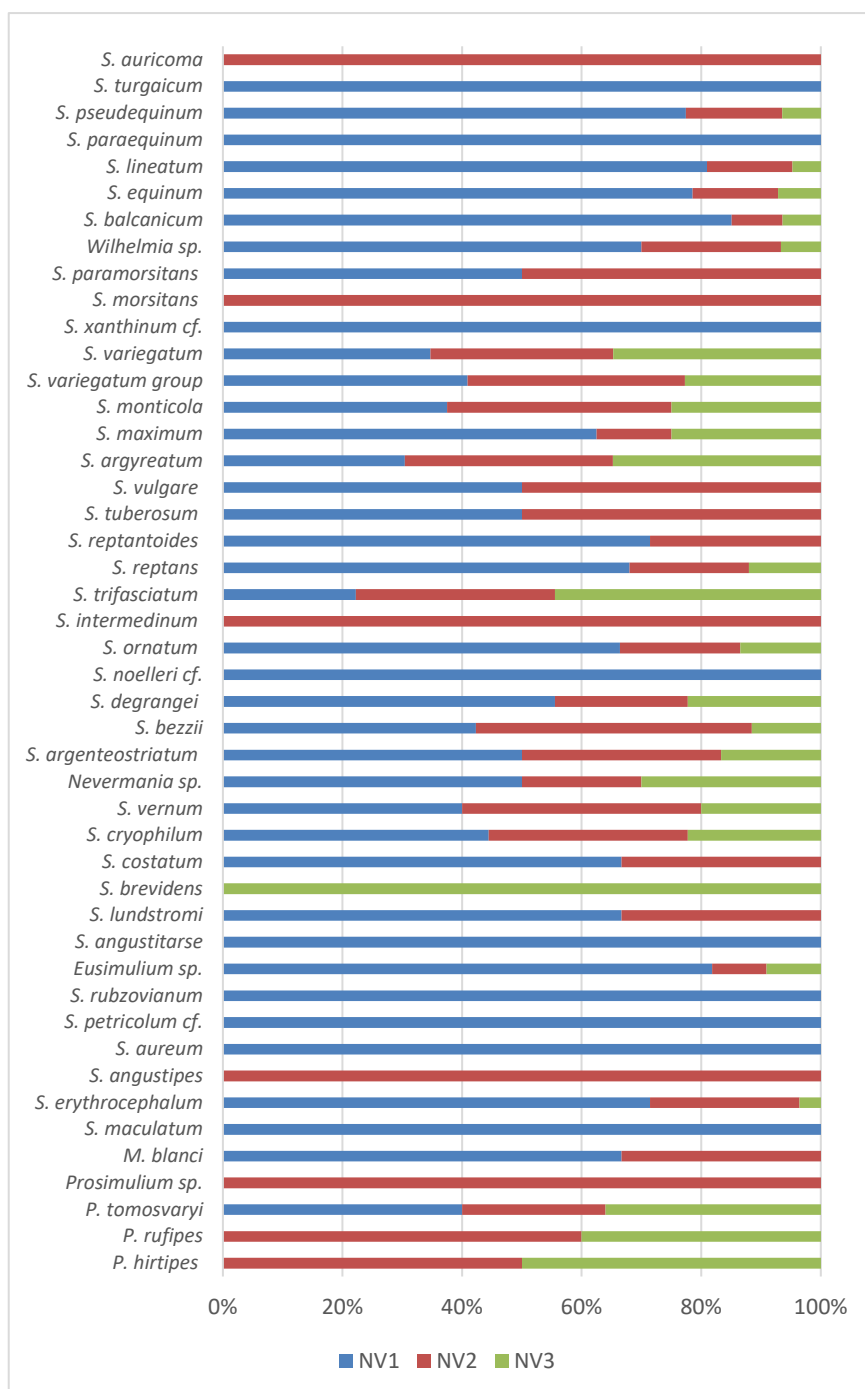


Slika 27. Mreža haplotipova dobijena od sekvenci gena mtCOI *S. reptantoides* korišćenjem programa Network (Librado & Rozas, 2009). Veličine krugova su proporcionalne učestalosti haplotipa. Boje i nazivi klada odgovaraju filogenetskom stablu.

REZULTATI

4.4. Analiza distribucije simulida u različitim tipovima staništa

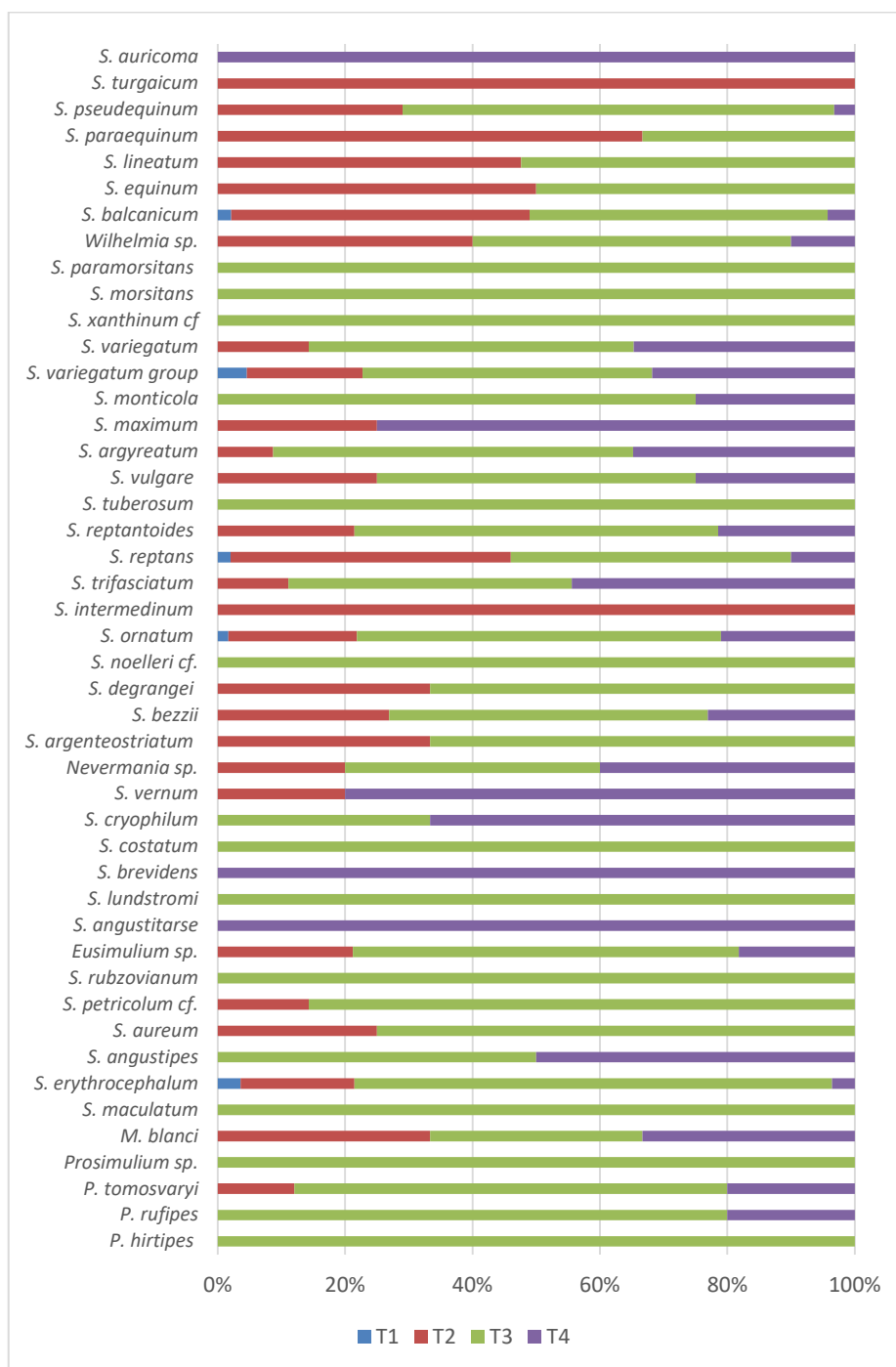
Distribucija simulida na različitim nadmorskim visinama prikazana je na grafiku (Slika 28). Vrste *S. turgaicum*, *S. paraequinum*, *S. xanthinum*, *S. noelleri*, *S. angustitarse*, *S. rubzovianum*, *S. petricolum*, *S. aureum* i *S. maculatum* su tokom ovog istraživanja zabeležene samo na nadmorskim visinama do 500 m (NV1). Vrste *S. auricoma*, *S. morsitans*, *S. intermedinum* i *S. angustipes* zabeležene su samo na nadmorskim visinama od 500–800m (NV2). Vrsta *S. brevidens* zabeležena je samo na nadmorskoj visini preko 800 m (NV3). Prisustvo 50% vrsta zabeleženih tokom ovog istraživanja uočeno je na svim nadmorskim visinama.



Slika 28. Distribucija analiziranih vrsta simulida prema kategorijama nadmorskih visina

REZULTATI

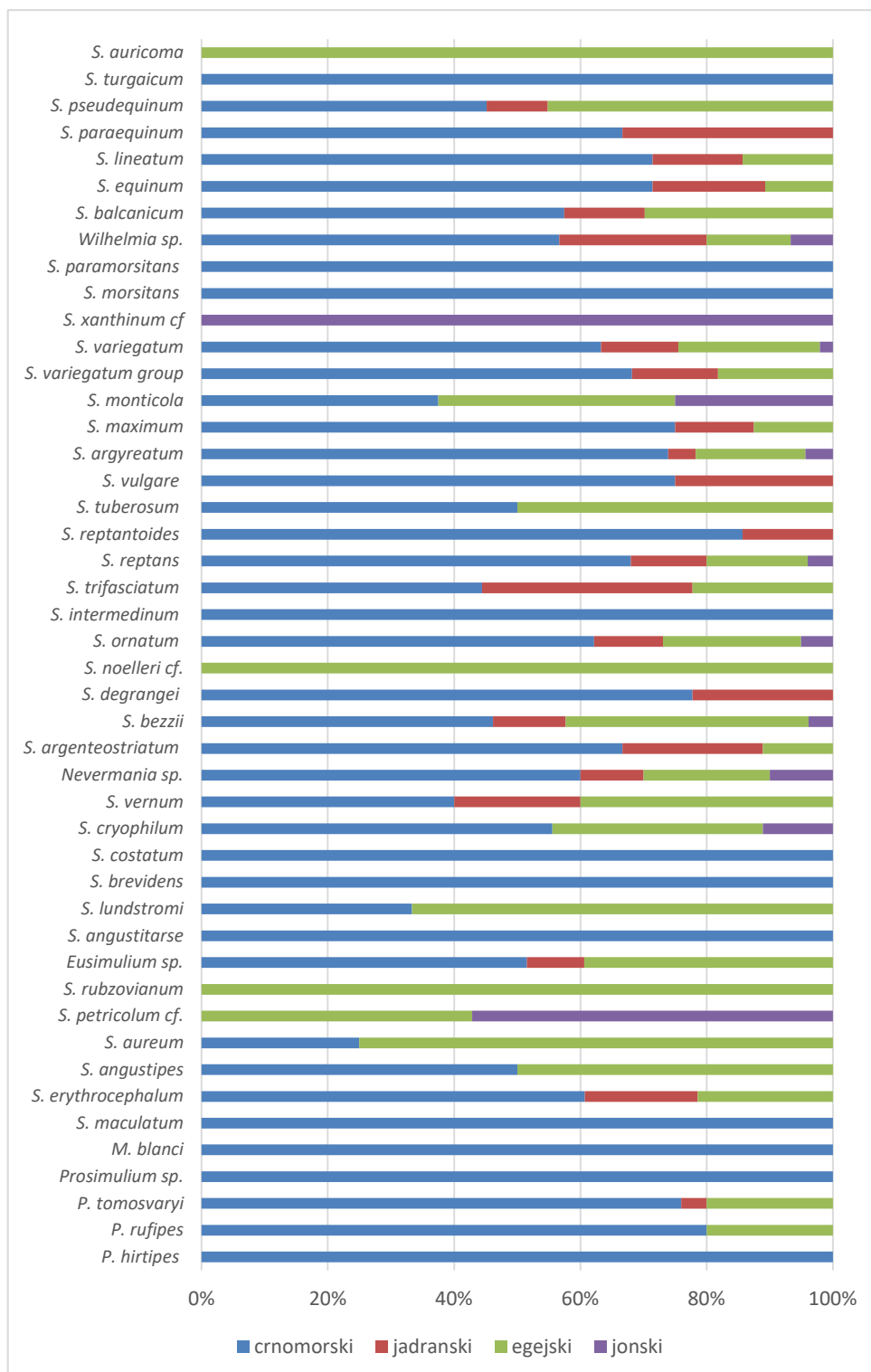
Distribucija simulida u različitim tipovima vodotoka prikazana je na Slici 29. Vrste *Simulium auricoma*, *S. brevidens* i *S. angustitarse* su tokom ovog istraživanja zabeležene samo u vodotocima tipa 4, tj. u izvorišnim regionima reka i potocima. Vrste *Simulium paramorsitans*, *S. morsitans*, *S. xanthinum*, *S. noelleri*, *S. costatum*, *S. lundstromi*, *S. rubzovianum*, *S. maculatum* i *P. hirtipes* su zabeležene samo u malim rekama sa krupnim substratom (T3). Vrstste *S. turgaicum* i *S. intermedinum* zabeležene su samo u srednjim i velikim rekama sa čvrstim substratom (T2), dok su *S. ornatum*, *S. reptans* grupa, *S. variegatum* grupa, *S. balcanicum* i *S. erythrocephalum* zabeležene u svim tipovima vodotoka.



Slika 29. Distribucija analiziranih vrsta simulida prema tipu vodotoka

REZULTATI

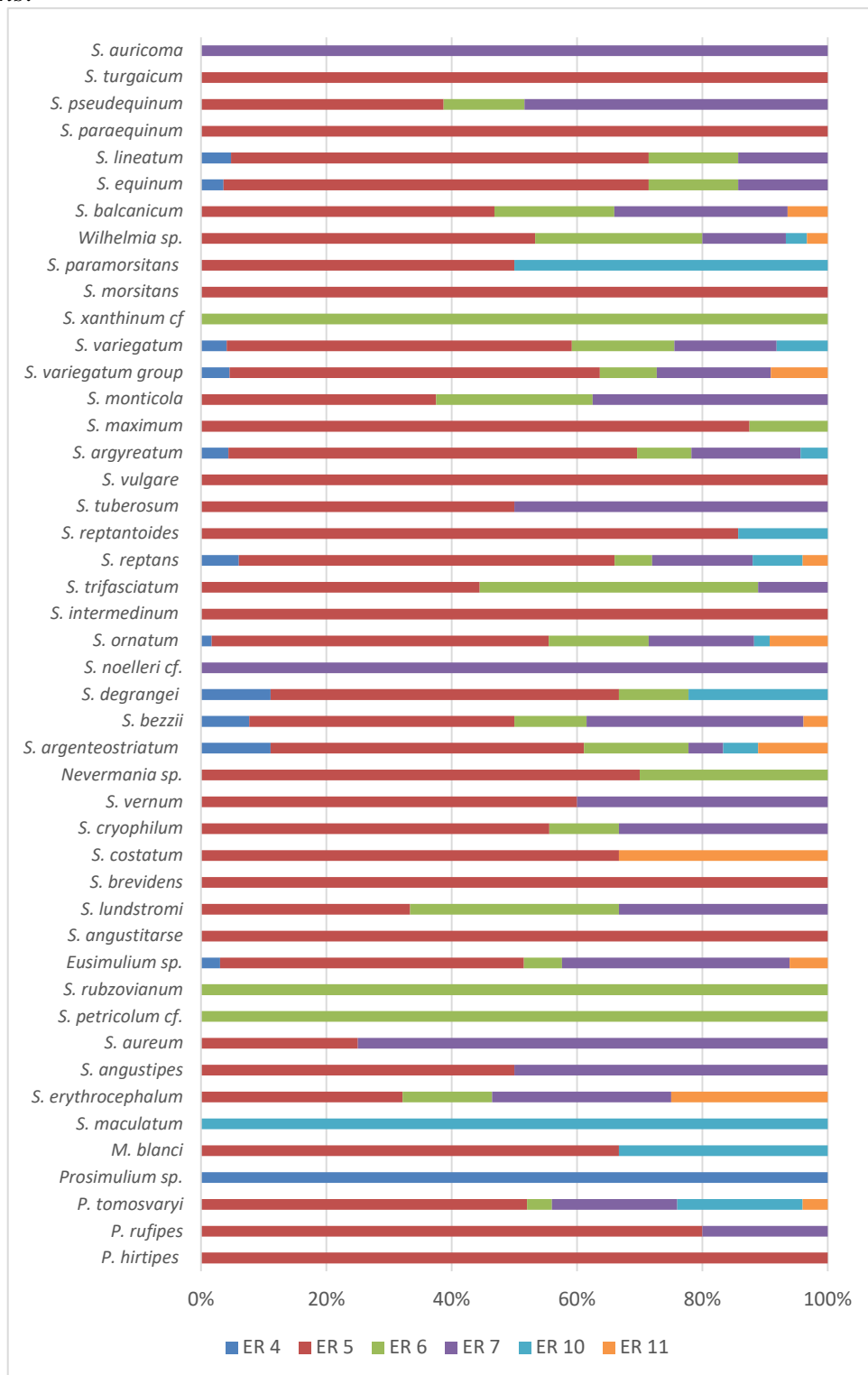
Distribucija simulida prema slivu kojem lokaliteti, gde je zabeleženo njihovo prisustvo, pripadaju prikazana je na slici 30. Vrste *Simulium auricoma*, *S. noelleri* i *S. rubzovianum* su tokom ovog istraživanja zabeležene samo u Egejskom slivu. Vrste *S. turgaicum*, *S. paramorsitans*, *S. morsitans*, *S. intermedinum*, *S. costatum*, *S. brevidens*, *S. angustitarse*, *S. maculatum*, *M. blanci* i *P. hirtipes* su zabeležene samo na lokalitetima koji pripadaju Crnomorskom slivu, dok je *S. xanthinum* pronađena samo na jednom lokalitetu Jonskog sliva. Ostale vrste zabeležene su u više slivova.



Slika 30. Distribucija analiziranih vrsta prema slivovima

REZULTATI

Distribucija simulida u različitim hidroekoregionima prikazana je na grafiku (Slika 31). Vrste *S. turgaicum*, *S. paraequinum*, *S. morsitans*, *S. vulgare*, *S. intermedium*, *S. brevidens*, *S. angustitarse* i *P. hirtipes* su tokom ovog istraživanja zabeležene samo u hidroekoregionu 5 (ER5, Dinarski Zapadni Balkan). Vrste *S. xanthinum*, *S. rubzovianum* i *S. petricolum* su zabeležene samo u ER6 (Grčki Zapadni Balkan). Vrste *S. auricoma* i *S. noelleri* zabeležene su samo u ER7 (Istočni Balkan), a *S. maculatum* samo u ER10 (Karpati). Jedina vrsta zabeležena u svim hidroekoregionima bila je *S. reptans*.

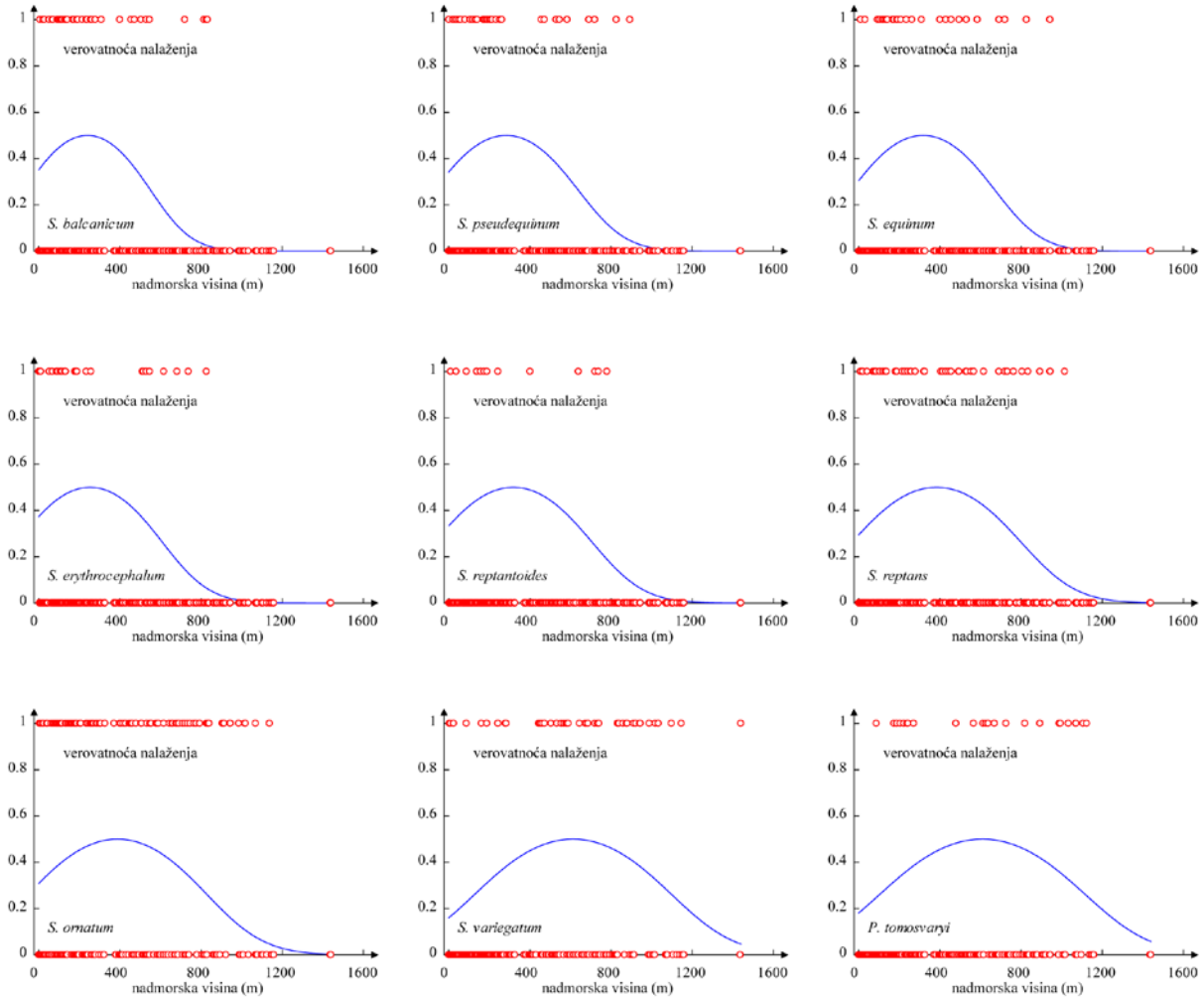


Slika 31. Distribucija analiziranih vrsta simulida u različitim hidroekoregionima

4.5. Ekološka diferencijacija simulida

4.5.1. Ekološka diferencijacija najčešćih vrsta simulida

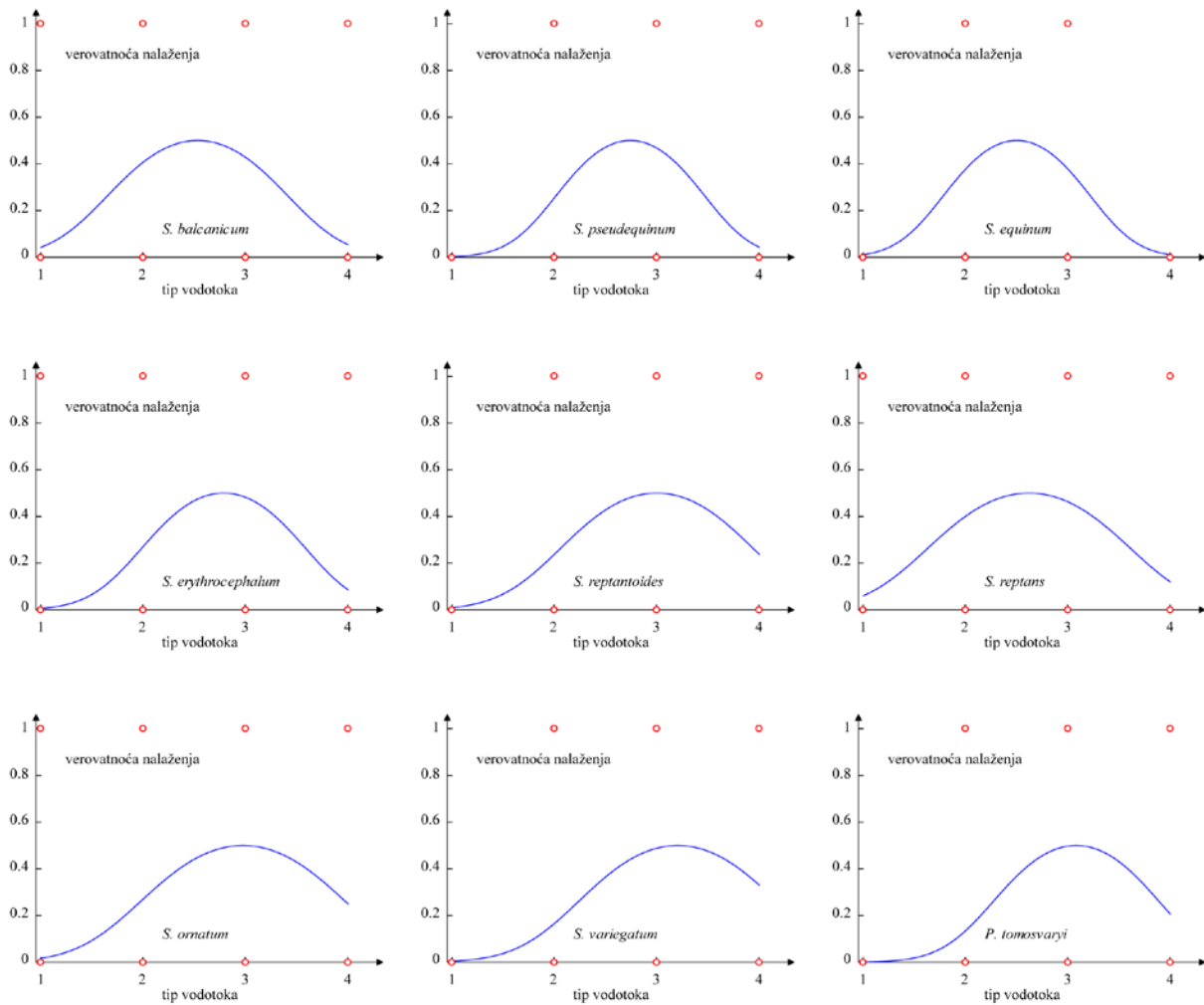
Analiza distribucije vrsta duž visinskog gradijenta urađena je za vrste sa visokom učestalošću pojavljivanja tokom istraživanja. Uočava se preklapanje distribucije vrsta duž visinskog gradijenta na osnovu rezultata dobijenih analizom Gausove logističke regresije (Slika 32). Vrste *S. balcanicum*, *S. equinum*, *S. pseudequinum*, *S. erythrocephalum* i *S. reptantoides* pokazuju ekološki optimum na približno 300 m nadmorske visine. Vrste *S. ornatum* i *S. reptans* imaju ekološki optimum oko 400 m nadmorske visine, dok je ekološki optimum, na osnovu Gausove krive, za distribuciju vrsta *P. tomosvaryi* i *S. variegatum* oko 600 m. Najvišu ekološku toleranciju, pokazuju vrste *S. variegatum*, *P. tomosvaryi* i *S. ornatum*, dok se najniža ekološka tolerancija uočava kod vrste *S. balcanicum*.



Slika 32. Ekološka diferencijacija odabranih vrsta simulida u odnosu na nadmorsku visinu. Krive odgovora analiziranih vrsta prikazuju verovatnoću nalaženja vrsta duž gradijenta. Krugovi označavaju prisustvo (1) odnosno odsustvo (0) analiziranih vrsta na lokalitetu.

REZULTATI

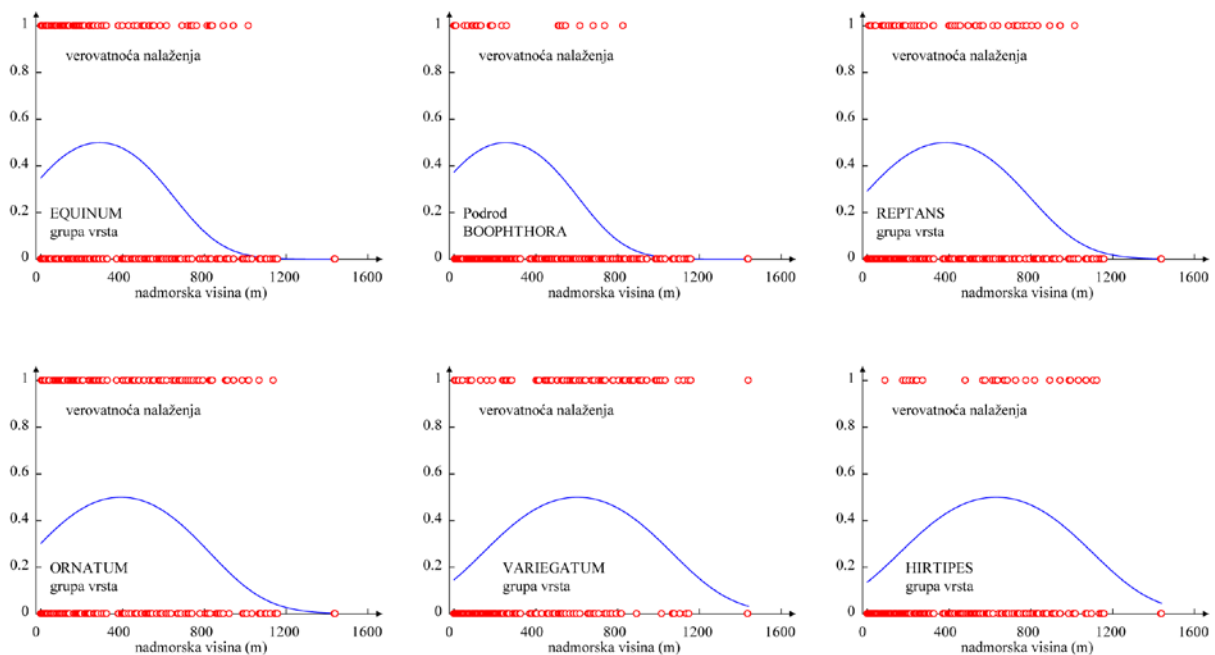
Preferenca vrsta prema tipu vodotoka na osnovu rezultata dobijenih analizom Gausove logističke regresije prikazana je na slici 33. Vrste *S. balcanicum*, *S. reptans*, *S. equinum*, *S. pseudequinum* i *S. erythrocephalum* preferiraju sve tipove reka sa bržim i turbulentijim kretanjem vode i krupnijim supstratom, kako velike i srednje reke tako i manje reke i potoke, odnosno ekološki optimum im je u tip 2 i tip 3 vodotoka. Vrste *S. variegatum*, *P. tomosvaryi*, *S. reptantoides* i *S. ornatum*, dominiraju u manjim vodotocima sa bržim tokom, odnosno optimalni tip vodotoka za ove vrste je tip 3. Najvišu ekološku tolerancu, kada su u pitanju tipovi vodnih tela, pokazuju vrste *S. reptans* i *S. balcanicum*. Uska ekološka toleranca zabeležena je kod vrste *S. equinum* i *S. pseudequinum*.



Slika 33. Ekološka diferencijacija odabranih vrsta simulida u odnosu na tip vodotoka. Krive odgovora analiziranih vrsta prikazuju verovatnoću nalaženja vrsta duž gradijenta tipa vodotoka. Krugovi označavaju prisustvo (1) odnosno odsustvo (0) analiziranih vrsta na lokalitetu.

4.5.2. Ekološka diferencijacija najčešćih grupa taksona simulida

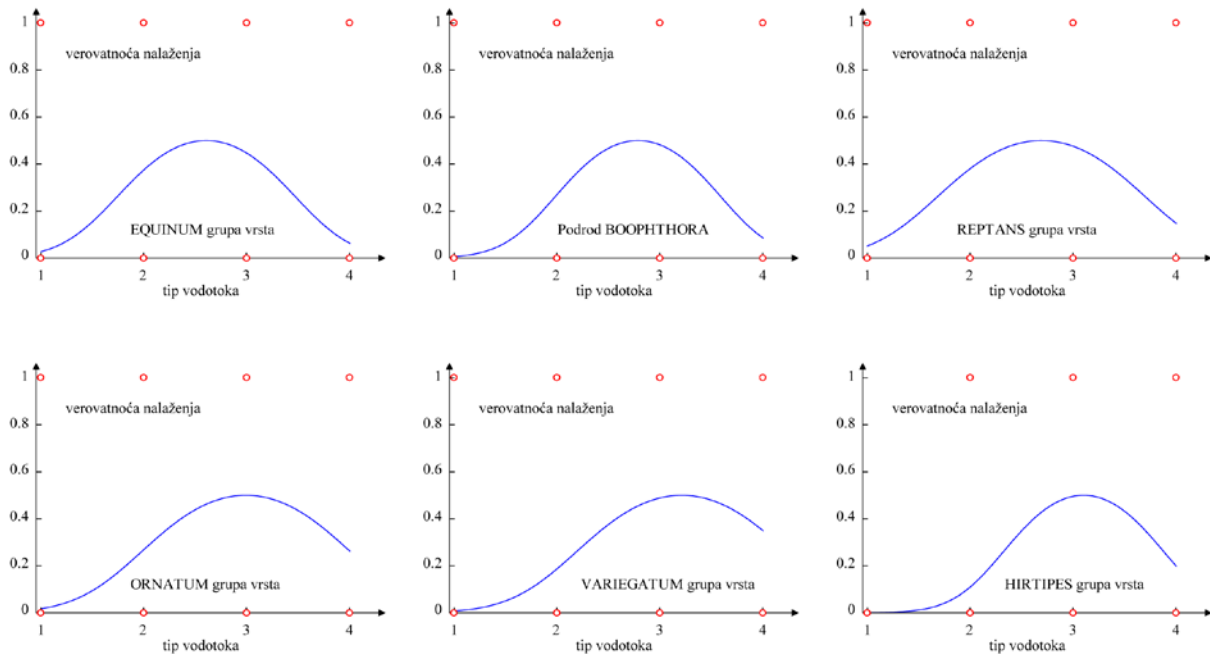
Analiza distribucije grupa taksona duž visinskog gradijenta urađena je za grupe taksona sa visokom učestalošću pojavljivanja tokom istaživanja i prikazana je na slici 34. Na osnovu rezultata dobijenih Gausovom logističkom regresionom analizom uočava se preklapanje distribucije svih grupa duž visinskog gradijenta, odnosno može se uočiti da je ekološki optimum za grupe vrsta EQUINUM, REPTANS, ORNATUM i podroda BOOPHTHORA približno isti i odgovara visini od 300 m do 400 m, s tim da EQUINUM grupa vrsta i podrod BOOPHTHORA pokazuje manju ekološku tolerancu na oko 300 m, a grupe vrsta REPTANS i ORNATUM na oko 400 m (Slika 34). Ekološki optimum grupa vrsta VARIEGATUM i HIRTIPES se razlikuje, i njihov optimum je oko 600 m, a ujedno imaju i najveću ekološku tolerancu.



Slika 34. Ekološka diferencijacija grupa taksona u odnosu na nadmorsku visinu. Krive odgovora analiziranih grupa vrsta prikazuju verovatnoću nalaženja istih duž gradijenta. Krugovi označavaju prisustvo (1), odnosno odsustvo (0) analiziranih vrsta na lokalitetu.

Preferenca grupa taksona prema tipu vodotoka na osnovu rezultata dobijenih Gausovom logističkom regresijom može se videti na slici 35. Ekološki optimum grupa vrsta EQUINUM i REPTANS i podroda BOOPHTHORA je tip 2 i tip 3 vodotoka, odnosno ove grupe vrsta preferiraju sve tipove reka sa bržim i turbulentnijim kretanjem vode i krupnijim substratom. Grupe vrsta ORNATUM, VARIEGATUM i HIRTIPES dominiraju u manjim vodotocima sa bržim tokom (tip 3). Ekološke tolerance grupa vrsta, kada su u pitanju tipovi vodnih tela, pokazuju uniformnost.

REZULTATI



Slika 35. Ekološka diferencijacija grupa vrsta u odnosu na tip vodotoka. Krive odgovora analiziranih vrsta prikazuju verovatnoću nalaženja vrsta duž gradijenta. Krugovi označavaju prisustvo (1) odnosno odsustvo (0) analiziranih vrsta na lokalitetu.

4.6. Zajednica simulida u različitim tipovima staništa

Rezultati multivarijatne analize varijanse (MANOVA) prikazani su na slici 36. Zajednice simulida grupisane su prema eko-geografskim karakteristikama lokaliteta na kojima su zabeležene, tipu vodotoka, slivu kome pripadaju, nadmorskoj visini i hidroekoregionu.

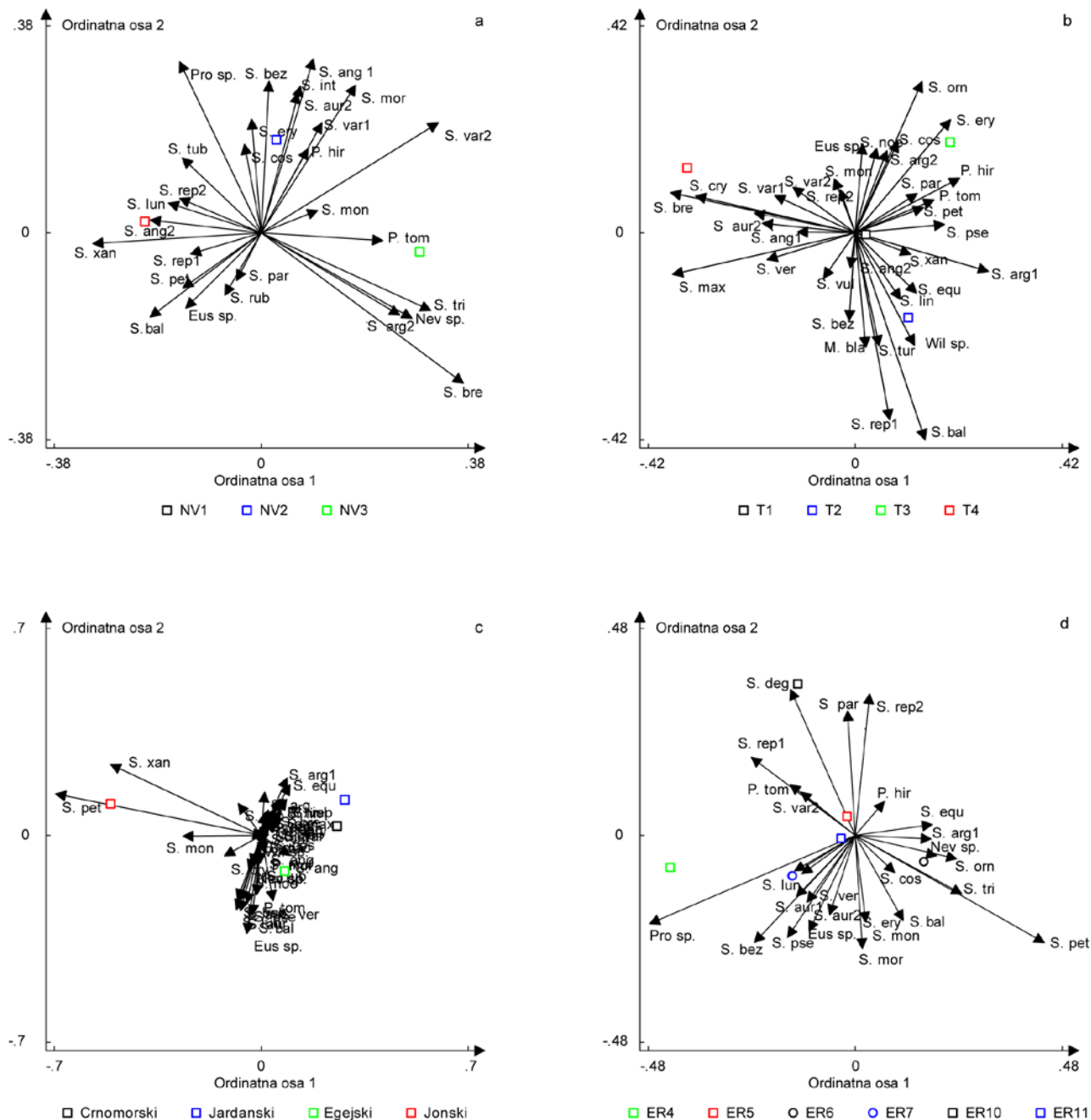
Kada se posmatra uticaj nadmorske visine na diferencijaciju zajednica simulida, može se uočiti da vrste *S. angustitarse*, *S. xanthinum*, *S. lundstromi* i *S. reptantoides* karakterišu lokalitete u nižim predelima (NV1), odnosno nadmorske visine do 500 m. Zajednice simulida koje naseljavaju više predele (NV3, iznad 800 m) a karakterisane su prisustvom vrste *P. tomosvaryi* odvojene su od prethodnih po prvoj ordinacionoj osi. Treća grupa zajednica simulida, koja se nalazi na nadmorskim visinama od 500–800m (NV3) a karakterišu je vrste *S. bezzii*, *S. angustipes*, *S. intermedinum* i *S. auricoma*, odvojena je od prethodne dve grupe po drugoj odrinacionoj osi (Slika 36a).

Na slici 36b prikazan je odnos zajednica u četiri tipa vodotoka. Zajednice u tri tipa vodotoka (T2, T3, T4) jasno su izdvojene po prisustvu karakterističnih vrsta. Vrste podroda *Wilhemia* se vezuju za velike i srednje reke koje odlikuje krupan supstat i brza voda (T2). Pored njih tu su i vrste *S. reptans* i *S. argyreatum*. Male, brze reke sa krupnim substratom (T3) karakteriše prisustvo vrsta *S. erythrocephalum*, *S. ornatum* i *P. hirtipes*, dok vrste *S. cryophilum* i *S. brevidens* karakterišu izvorišne regione.

Na slici 36c prikazan je odnos zajednica vrsta određen na osnovu morskog sliva kome vodotoci u kojima su zabeleženi pripadaju. Analiza je izdvojila samo zajednice koje pripadaju Jonskom slivu a karakterišu ih vrste *S. petricolum* i *S. xanthinum*. Ostali slivovi se prema zajednicama simulida ne razlikuju značajno.

REZULTATI

Odnos zajednica grupisanih prema hidroekoregionima prikazan je na slici 36d. Zajednice koje pripadaju Karpatskom regionu (ER10) odvajaju se po drugoj ordinacionoj osi od ostalih, sa karakterističnom vrstom *S. degrangei*. Vrste roda *Prosimulium* diferenciraju zajednice Alpskog regiona (ER4). Istočni Balkan (ER7) izdvaja vrsta *S. lundstromi*, dok Grčki Zapadni Balkan (ER6) odvajaju vrste roda *Nevermannia*, *S. ornatum*, *S. argenteostriatum*, *S. petricolum* i *S. trifasciatum*. Zajednice hidroekoregiona 5 (Dinarski Zapadni Balkan) i 11 (Mađarska ravnica) ne pokazuju diferencijaciju u odnosu na ostale.



Slika 36. MANOVA analiza odnosa zajednica simulida u različitim tipovima ekosistema a) prema kategorijama nadmorskih visina, b) prema tipu vodotoka u kome su zabeležene, c) na osnovu sliva u kome su zabeležene, d) na osnovu hidroekoregiona u kome su zabeležene. Kvadrati i krugovi predstavljaju centroide grupa zajednica (lokaliteta). Nazivi taksona sa skraćenicama dati su u Tabeli 3, poglavlje 4.2.

REZULTATI

Rezultati multivarijatne analize varijanse (MANOVA) zajednica simulida sa grupama taksona koje ih karakterišu prikazani su na slici 37.

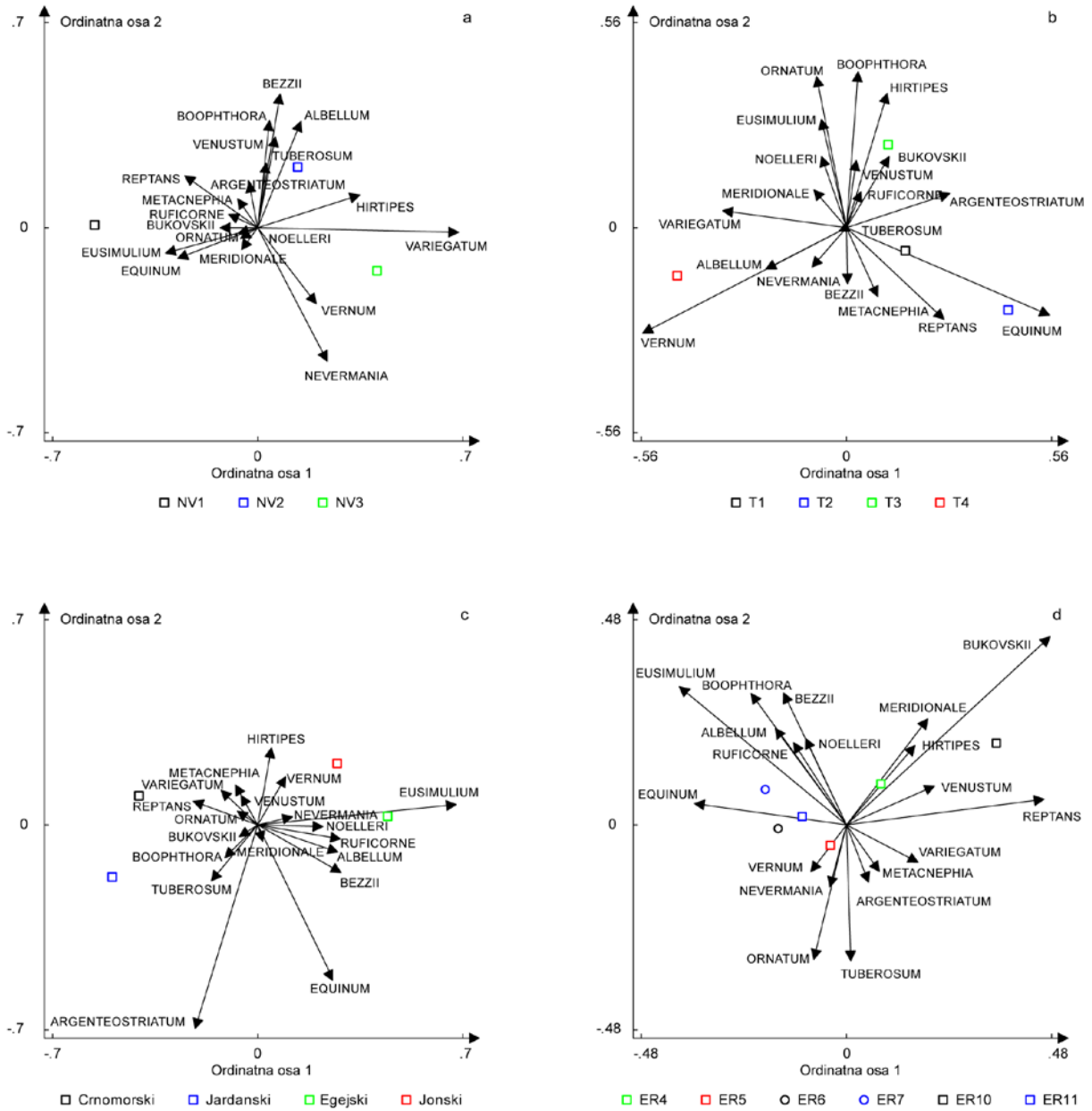
Diferencijacija zajednica simulida grupisanih prema nadmorskoj visini prikazana je na slici 37a. EQUINUM grupa vrsta kao i podrod EUSIMULIUM, a u manjoj meri i REPTANS grupa vrsta karakterišu niže nadmorske visine (NV1). ALBELLUM grupa vrsta, HIRTIPES i BEZZII se vezuju za srednje nadmorske visine 500–800m (NV2), dok su s nadmorskim visina preko 800m (NV3) povezane grupa vrsta VARIEGATUM, a donekle i VERNUM i podrod NEVERMANNIA.

Na slici 37b prikazan je odnos zajednica grupa taksona na osnovu tipa vodotoka. Tip 2 vodotoka (velike i srednje reke sa krupnim supstratom i bržim vodenim tokom) karakteriše EQUINUM grupa vrsta. VERNUM i ALBELLUM grupe vrsta karakterišu izvorišne regione reka i potoka (tip 4), dok se grupa vrste HIRTIPES i BUKOVSKII vezuju za male vodotoke koji pripadaju tipu 3.

Odnos zajednica grupa taksona određenih na osnovu sliva kome pripadaju prikazan je na slici 37c. Grupe vrsta VARIEGATUM i REPTANS vezuju se za Crnomorski sliv. Jadranski sliv odvajaju ARGENTEOSTRIATUM i TUBEROSUM grupa vrsta, dok VERNUM grupa vrsta izdvaja zajednice Jonskog sliva. Za Egejski sliv karakteristični su podrod EUSIMULUM i grupe vrsta NOELLERI i RUFICORNE.

Uticaj geografskog položaja odnosno hidroekoregiona kome pripadaju lokaliteti na kojima su zabeležene zajednice simulida prikazan je na Slici 37d. Prema rezultatima MANOVA analize, hidroekoregion 4 (Alpi) definišu grupe vrsta HIRTIPES i MERIDIONALE. Grupe vrsta VERNUM i ORNATUM i podrod NEVERMANNIA određuju hidroekoregion 5 (Dinarski Zapadni Balkan). EQUINUM grupa vrsta karakteristična je za hidroekoregione 6 (Grčki Zapadni Balkan) i 11 (Mađarska ravnica). Ova grupa vrsta zajedno sa podrodom EUSIMULUM i grupom vrsta BOOPHTHORA definiše i hidroekoregion 7 (Istočni Balkan). Za hidroekoregion 10 (Karpati) karakteristične su grupe vrsta BUKOVSKII i VENUSTUM.

REZULTATI



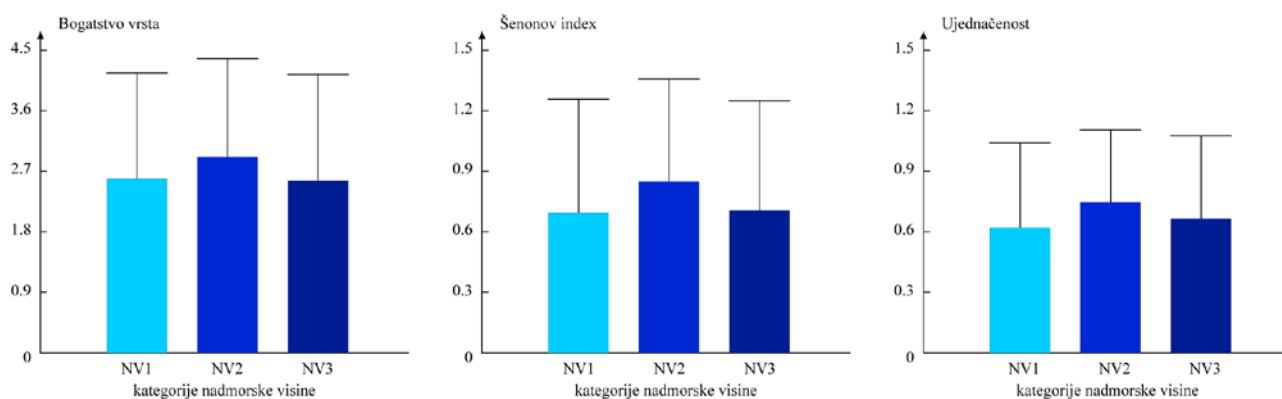
Slika 37. MANOVA analiza odnosa zajednica grupa taksona simulida u različitim tipovima ekosistema a) prema kategorijama nadmorskih visina, b) prema tipu vodotoka u kome su zabeležene, c) na osnovu sliva u kome su zabeležene, d) na osnovu hiroekoregiona u kome su zabeležene. Kvadrati i krugovi predstavljaju centroeide grupa zajednica (lokaliteta).

4.7. Diverzitet simulida u različitim tipovima staništa

4.7.1. Analiza alfa diverziteta zajednica simulida

Alfa diverzitet, odnosno njegove komponente, analiziran je unutar zajednica simulida zabeleženih na različitim nadmorskim visinama, u različitim tipovima vodotoka, slivovima i hidroekoregionima.

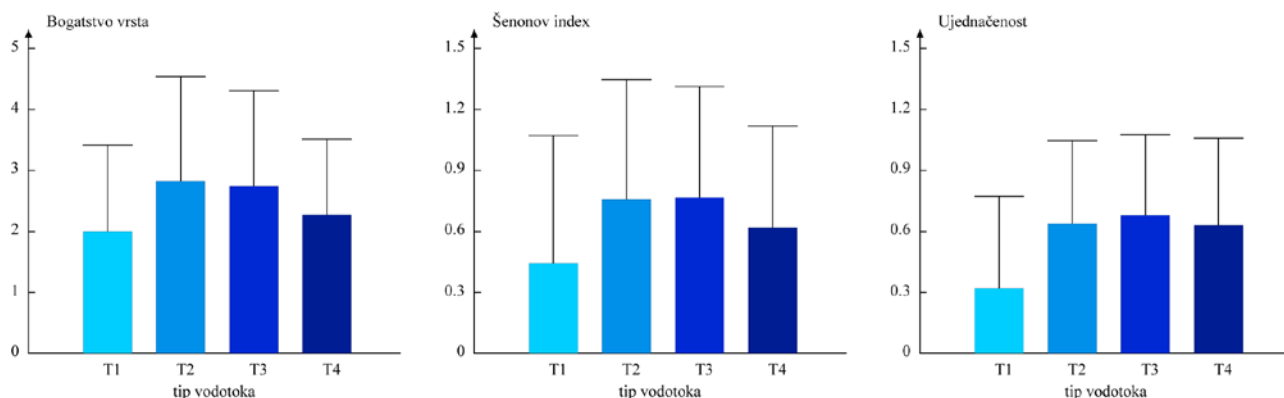
U odnosu na komponente alfa diverziteta zajednice se na različitim nadmorskim visinama ne razlikuju mnogo. Najveći broj vrsta simulida zabeležen je na nadmorskim visinama od 500 do 800 m (NV2), dok je nešto manje bogatstvo vrsta zabeleženo na nadmorskim visinama od 0 do 500 m i iznad 800 m (NV1, NV3). Šenonov indeks i ekvitalnost (ujednačenost brojnosti vrsta) takođe ukazuju na najveći diverzitet zajednice simulida na nadmorskim visinama od 500 do 800 m (Slika 38). Ukoliko se uzmu u obzir sve tri komponente *alfa* diverziteta zajedno, najveći *alfa* diverzitet karakteriše NV2 zajednice mada su razlike zanemarljive (nisu statistički značajne).



Slika 38. Komponente ukupnog *alfa* diverziteta (bogatstvo vrsta, Šenonov indeks i ekvitalnost) u zajednicama simulida na nadmorskim visinama do 500 m (NV1), 500–800 m (NV2), i preko 800 m (NV3). Za svaku grupu je prikazana srednja vrednost (stubići) i standardna devijacija (linije) bogatstva vrsta, Šenonovog indeksa i ekvitalnosti na različitim nadmorskim visinama.

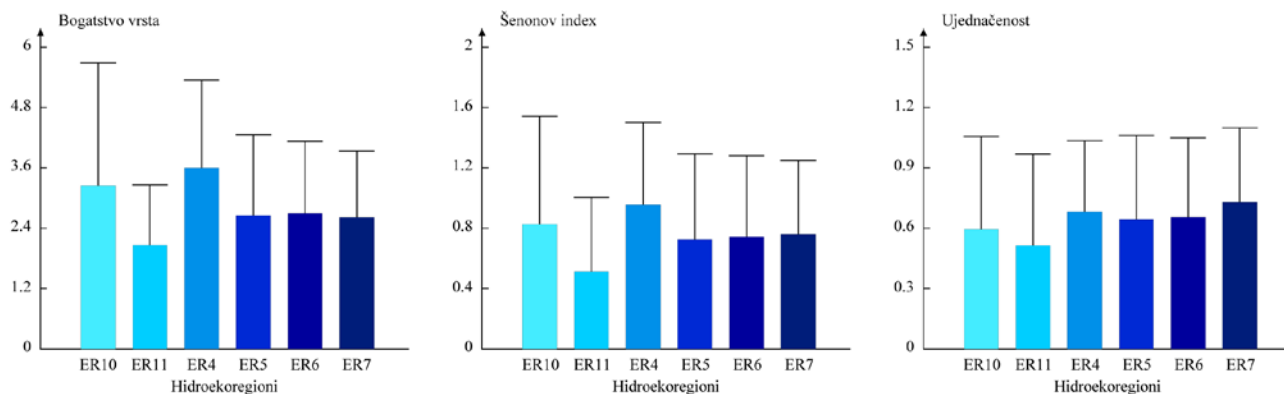
Suprotno od ujednačenosti zajednica simulida među nadmorskim visinama, u različitim tipovima vodotoka razlika u diverzitetu zajednica simulida je uočljivija, iako takođe statistički neznačajna (Slika 39). Najveći broj vrsta zabeležen je u velikim i srednjim rekama sa krupnijom podlogom i brzog toka (T2) i malim rekama sa čvrstim supstratom (T3), dok je nešto manje bogatstvo vrsta zabeleženo u izvorišnom regionu (T4), i u velikim rekama sporijeg toka sa finim sedimentom (T1). Šenonov indeks takođe pokazuje najnižu vrednost u tipa 1, dok se skoro dvostruko veće vrednosti beleže u vodotocima tipa 2 i tipa 3. Ujednačenost brojnosti vrsta pokazuje isti trend kao Šenonov indeks. Ukoliko se uzmu u obzir sve tri komponente zajedno, viši *alfa* diverzitet karakteriše vodotoke tipa 2, 3 i 4 a najniži vodotoke tipa 1.

REZULTATI



Slika 39. Komponente ukupnog *alfa* diverziteta (bogatstvo vrsta, Šenonov indeks, ekvitabilnost) u zajednicama simulida u različitim tipovima vodotoka (T1 – velike ravničarske reke sporog toka sa finim sedimentom, T2 – velike i srednje reke bržeg toka sa krupnim sedimentom, T3 – Male reke, brzog toka sa krupnom podlogom i T4 – izvorišni region). Za svaku grupu je prikazana srednja vrednost (stubići) i standardna devijacija (linije) bogatstva vrsta, Šenonovog indeksa i ekvitabilnosti u različitim tipovima vodotoka.

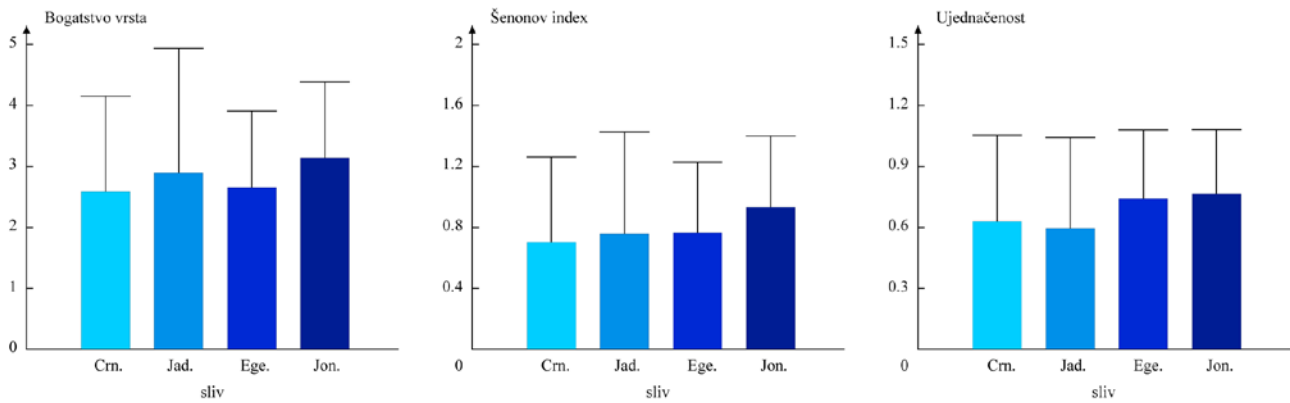
Komponente *alfa* diverziteta zajednica u različitim hidroekoregionima prikazane su na slici 40. Najveće bogatstvo vrsta uočava se u hidroekoregionima ER4 (Alpi) i ER10 (Karpata). Nešto manji broj vrsta simulida zabeležen je u hidroekoregionima Grčki Zapadni Balkan (ER6), Dinarski Zapadni Balkan (ER5) i Istočni Balkan (ER7), a najmanji broj vrsta zabeležen je u ER11 (Mađarska ravnica). Šenonov indeks pokazuje isti trend kao i bogatstvo vrsta. Ekvitabilnost je s druge strane dosta ujednačena u svim hidroekoregionima. Uzimajući u obzir sve tri komponente, najviši *alfa* diverzitet uočava se u ER4, a najniži u ER11.



Slika 40. Komponente ukupnog *alfa* diverziteta (bogatstvo vrsta, Šenonov indeks, ekvitabilnost) u zajednicama simulida u različitim hidroekoregionima: ER4 (Alpi), 5 (Dinarski Zapadni Balkan), ER6 (Grčki Zapadni Balkan), ER7 (Istočni Balkan), ER10 (Karpata) i ER11 (Mađarska ravnica). Za svaku grupu je prikazana srednja vrednost (stubići) i standardna devijacija (linije) bogatstva vrsta, Šenonovog indeksa i ekvitabilnosti u različitim ekoregionima.

Zajednice koje pripadaju različitim slivovima se ne razlikuju mnogo prema komponentama *alfa* diverziteta (Slika 41).

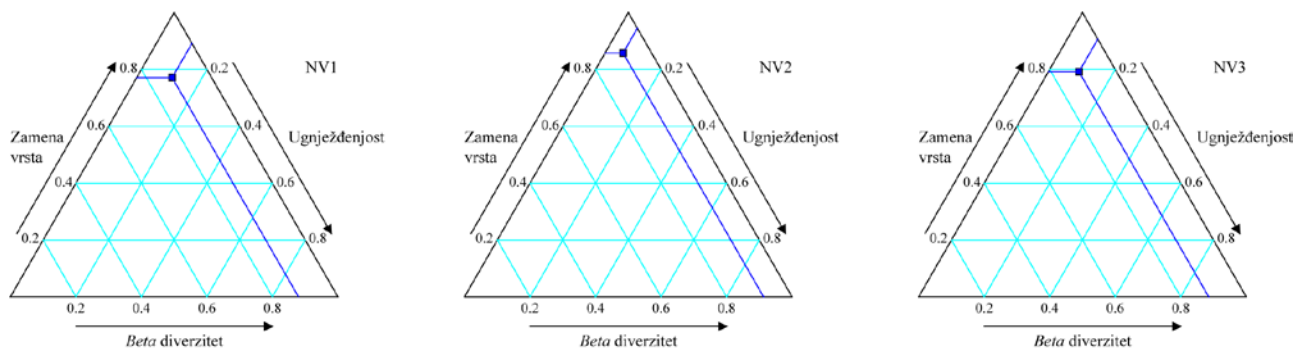
REZULTATI



Slika 41. Komponente ukupnog *alfa* diverziteta (bogatstvo vrsta, Šenonov indeks, ekvitabilnost) u zajednicama simulida u različitim slivovima: 1 - Crnomorskom, 2 – Jadranskom, 3 – Egejskom, i 4 – Jonskom slivu. Za svaku grupu je prikazana srednja vrednost (stubići) i standardna devijacija (linije) bogatstva vrsta, Šenonovog indeksa i ekvitabilnosti različitih slivova.

4.7.2. Analiza beta diverziteta zajednica simulida

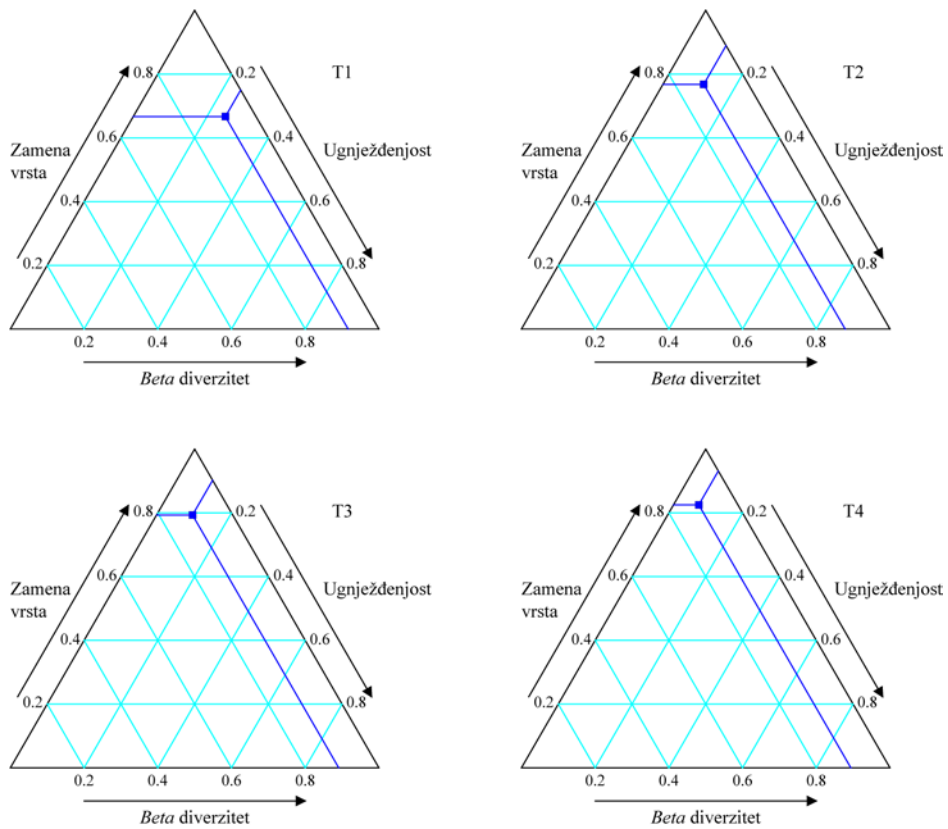
Ukupni *beta* diverzitet i njegove komponente, prema kategorijama nadmorskih visina prikazani su na slici 42. Sve kategorije nadmorskih visina karakteriše sličan trend, odnosno visoke vrednosti zamene vrsta i niska vrednost ugnježđenosti, tj. mala razlika u bogatstvu vrstama. Ovo pokazuje da je zamena vrsta značajnija komponenta za *beta* diverzitet od samog gubitka vrsta. Najviši *beta* diverzitet zabeležen je na nadmorskim visinama od 500 do 800 m (NV2).



Slika 42. Komponente *beta* diverziteta (Baselga, 2010) prema kategorijama nadmorskih visina: NV1 (do 500 m), NV2 (500–800 m), NV3 (preko 800 m).

Ukupni *beta* diverzitet prema tipu vodotoka, ima slične trendove kao i *beta* diverzitet zajednica na različitim nadmorskim visinama (Slika 43). Sve tipove vodotoka karakterišu visoke vrednosti zamene vrsta i niska vrednost ugnježđenosti. Jedino se u velikim rekama (T1) uočava nešto manja zamena vrsta i veća ugnježđenost u odnosu na ostale tipove vodotoka te je i sam *beta* diverzitet nešto viši.

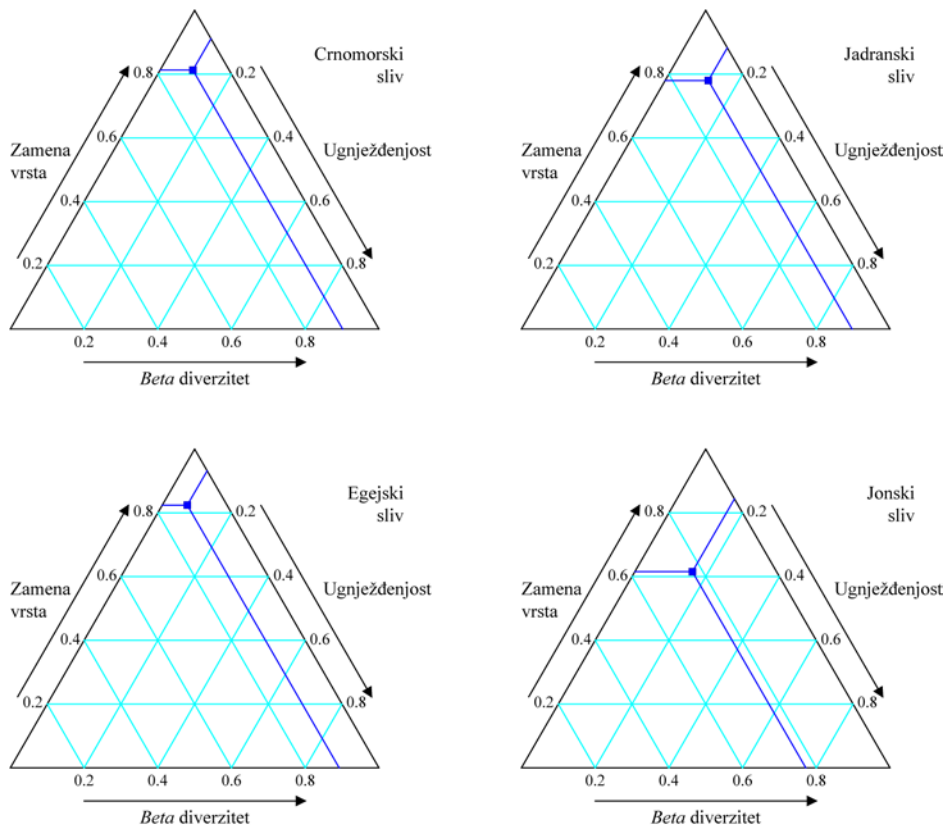
REZULTATI



Slika 43. Komponente *beta* diverziteta (Baselga, 2010) prema tipu vodotoka: T1 – velike ravničarske reke sporog toka sa finim sedimentom, T2 – velike i srednje reke brzog toka sa krupnim sedimentom, T3 – Male reke, brzog toka sa krupnom podlogom i T4 – izvorišni region.

Ukupni *beta* diverzitet prema slivu kome lokaliteti pripadaju, takođe karakterišu visoke vrednosti zamene vrsta i niska vrednost ugnježdenosti (Slika 44). Crnomorski, Jadranski i Egejski sliv opisuje visok *beta* diverzitet sa vrednosti oko 0,9. Iako je dosta visok, najniži *beta* diverzitet uočava se u Jonskom slivu (0,8) a karaterišu ga nešto niže vrednosti zamene vrsta u odnosu na druge slivove.

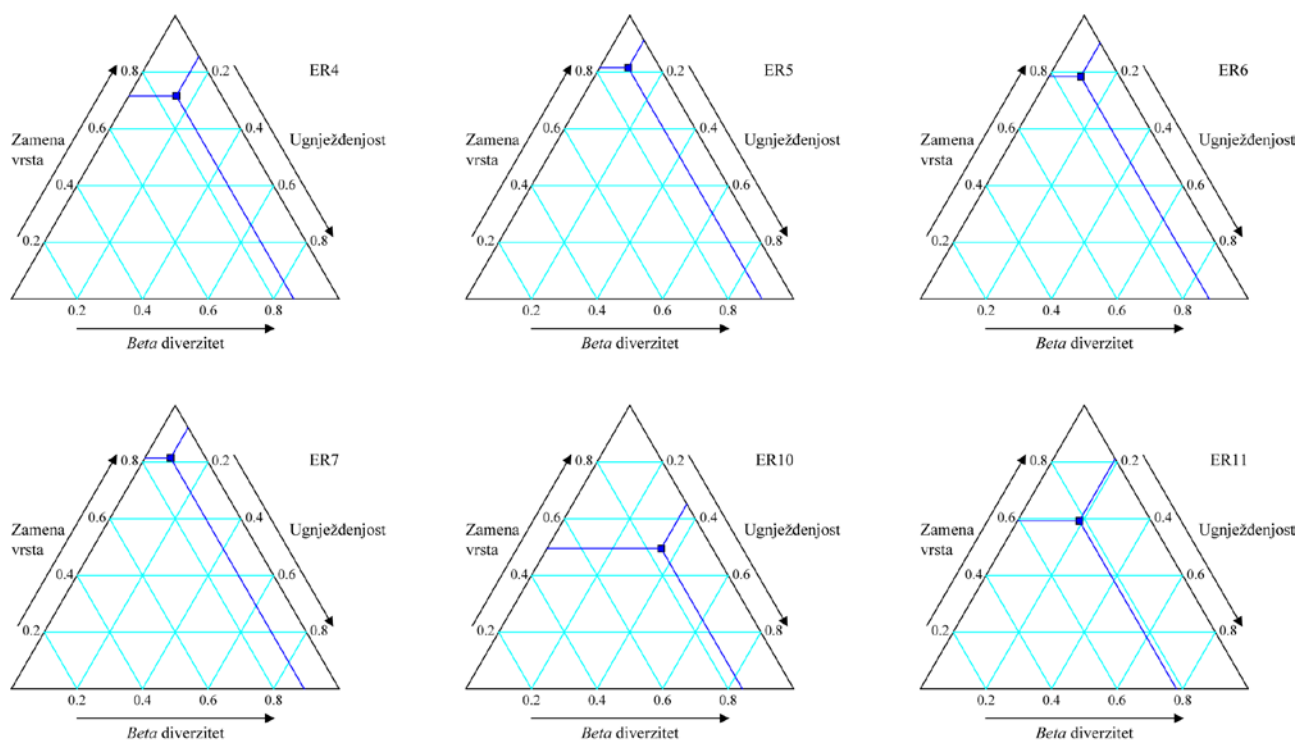
REZULTATI



Slika 44. Komponente *beta* diverziteta (Baselga, 2010) prema slivu:
a – Crnomorski, b – Jadranski, c – Egejski i d– Jonski.

Ukupni *beta* diverzitet prema hidroekoregionu kom lokalitet pripada, ima isti trend (Slika 45). Sve hidroekoregione karakterišu visoke vrednosti zamene vrsta i niska vrednost ugnježdenosti, pa je samim tim zamena vrsta dominantnija komponenta *beta* diverziteta. Tako hidroekoregioni ER5, ER6 i ER7 imaju veoma sličnu vrednost *beta* diverziteta i njegovih komponenti. Slična situacija je i u ER4, dok hidroekoregione ER11 i ER10 karakteriše nešto niži *beta* diverzitet, uzrokovan nižim vrednostima zamena vrsta i višim vrednostima ugnježdenosti u odnosu na druge analizirane hidroekoregione.

REZULTATI



Slika 45. Komponente *beta* diverziteta (Baselga, 2010) prema hidroekoregionima: ER4 (Alpi), ER5 (Dinarski Zapadni Balkan), ER6 (Grčki Zapadni Balkan), ER7 (Istočni Balkan), ER10 (Karpatai) i ER11 (Mađarska ravnica).

DISKUSIJA

Intenzivna terenska istraživanja pružila su jasniji uvid u diverzitet familije Simuliidae na Balkanskom poluostrvu. Tokom ovih istraživanja vrsta *Simulium ornatum* je bila najbrojnija i najrasprostanjenija vrsta, čije je prisustvo zabeleženo na 119 od 256 ispitivanih lokaliteta. Druge izrazito zastupljene vrste bile su *S. reptans*, *S. variegatum* i *S. balcanicum*. Ovo je u skladu sa prethodnim podacima o distribuciji simulida na Balkanskom poluostrvu. Tako, Živković (1961) zaključuje da je najčešće prisutna vrsta, na teritoriji SFRJ, *S. ornatum*, a kao drugu po rasprostranjenosti navodi vrstu *S. reptans*. Kao najzastupljeniju vrstu u Makedoniji Živković (1961) beleži vrstu *S. balcanicum* našavši je u 50% ispitivanih vodotoka, dok je u Srbiji prisutna u 27% vodotoka. Ignjatović Ćupina (2011) takođe beleži vrstu *S. ornatum* kao dominantnu vrstu simulida u potočnim staništima Fruške Gore, nalazeći je na 22 od 25 ispitivanih lokaliteta.

Ukoliko posmatramo brojnost jedinki vrsta zabeleženih tokom istraživanja, na drugom mestu (odmah posle *S. ornatum*) je *S. balcanicum*, zatim *P. hirtipes* i *S. erythrocephalum*. Živković konstatuje da se *S. erythrocephalum* retko sreće na prostorima bivše Jugoslavije (Živković, 1961), da bi kasnije zaključila da u Tamišu po gustini populacije *S. erythrocephalum* zauzima drugo mesto, odmah iza vrste *S. maculatum* (Živković, 1969), a u Dunavu po učestalosti nalaza takođe zauzima drugo mesto, odmah iza *S. reptans* (Živković, 1971).

Većinu zabeleženih vrsta odlikuje široko rasprostranjenje, izražena morfološka varijabilnost i veliki broj sinonima. Vrsta *S. ornatum* predstavlja kompleks od pet sestrinskih vrsta (citoformi) (Adler & Crosskey, 2009), dok su *S. reptans* i *S. reptatoides* opisane sa po dve forme (Day i sar., 2008). Široko rasprostranjene vrste kao *S. variegatum*, *S. argyreatum* i *S. monticola* pokazuju malu interspecijsku genetičku varijabilnost što implicira da bi mogle biti konspecifične (Ruiz-Arrondo i sar., 2018). Iz ovog razloga analizirani su genetička varijabilnost i filogenetski odnosi na primeru vrsta iz podroda *Wilhelmia*, kao i dve vrste REPTANS grupe vrsta.

5.1. Genetička varijabilnost vrsta podroda *Wilhelmia*

Na Balkanskom poluostrvu je u okviru podroda *Wilhelmia* na osnovu morfoloških karakter identifikovano 7 vrsta. Filogenetske analize su prepoznale 15 monofiletskih klada (potencijalnih vrsta). Analize su otkrile dve glavne grane unutar podroda *Wilhelmia*. Jedna grana je obuhvatala morfo-vrste *S. equinum* i *S. pseudequinum*, dok je druga obuhvatala morfo-vrste *S. sergenti*, *S. paraequinum*, *S. lineatum*, *S. turgaicum* i *S. balcanicum*. I u ranijim radovima su zabeležena identična razdvajanja na osnovu politenih hromozoma larvi (Weber i Grunewald, 1989; Petrova i sar., 2003; Chubareva i sar., 2007; Huang i sar., 2012; Adler i sar., 2015). Osvrćući se na prethodna istraživanja, grupe su imenovane kao (*Wilhelmia*) *equina* grupa i (*Wilhelmia*) *salopiensis* grupa (Chubareva i sar., 2007) a kako se *W. salopiensis* smatra sinonimom za *S. lineatum* (Adler i Crosskey, 2018), odlučeno je se da ova granam dobije naziv *lineatum* granom. Položaji nekih linija u okviru *lineatum* grane su se razlikovali među ML, MP i Bajesovim filogenetskim stablima. Evolutivni odnosi vrsta podroda *Wilhelmia* koje smo dobili na osnovu topologije Bajesovog stabla bili su u skladu sa prethodno opisanim evolucionim odnosima dobijenim upoređivanjem hromozomskih karaktera (Petrova i sar., 2003; Chubareva i sar., 2007).

5.1.1. *Equinum* grana

U prethodnim studijama (Weber i Grunewald, 1989; Chubareva i sar., 2007; Huang i sar., 2012; Adler i sar., 2015) uočene su sledeće kariološke karakteristike *equinum* grane: hromozomi su nepovezani – ne stvaraju hromocentar, prošireni region je prisutan u hromozomu I, marker ispupčenja i Balbijanijev prsten su u distalnijem, subterminalnom regionu IIS-a

Unutar grane *equinum*, svi uzorci su morfološki identifikovani kao pripadnici dve široko rasprostranjene vrste, *S. equinum* i *S. pseudequinum*, za koje se molekularnim analizama pokazalo

da nisu monofiletske. Postojanje šest klada u filogenetskom stablu (slika 2) potvrđeno je i GMIC analizom i mrežom haplotipova. Genetička udaljenost između dve klade (*S. pseudeuinum* W1 i *S. pseudequinum* W2) bila je niska (2,59%), na osnovu čega se zaključuje da je između njih kasnije došlo do razdvajanja. Ostale udaljenosti među kladama u ovoj filogenetskoj grani bile su visoke (8,33-17,79%), što implicira da je svaka pojedinačna klada potencijalna vrsta.

Većina sekvenci morfo-vrste *S. equinum* formirala je monofiletsku kladu koju smo nazvali *S. equinum*. Ova najmlađa klada u grani je najrasprostranjenija, a ujedno i haplotipski najraznovrsnija. Mala, ranije odvojena klada „*S. equinum*” koju čine sekvence dobijene iz jedinki poreklom iz Turske i Finske nazvana je *S. equinum* 2. Morfološki karakteri na osnovu kojih su ove jedinke iz Finske (BOLD Systems) identifikovane kao *S. equinum* su široke škrge lutaka bez bazalnog suženja (Rivosecchi, 1978). Međutim, nekoliko podvrsta ove vrste je opisano u ključevima za identifikaciju simulida istočne Evrope (Rubcov, 1956; Yankovsky, 2002), ponekad čak i kao različite vrste (npr. *S. ivashentzovi* Rubtsov, 1940). Analize jedinki svih podvrsta su neophodne da bi se bolje definisala ova kriptična klada pronađena u Turskoj i Finskoj, i da bi se definisale morfološke osobine koje diskriminišu ovu kladu od „tipične“ klade *S. equinum*.

Jedinke identifikovane kao *Simulium pseudequinum* grupisane su u četiri divergentne klade. Na osnovu rezultata, vreme diferencijacije klada desilo se u periodu pre 46–21 miliona godina. U to vreme, regioni u kojima su danas rasprostranjene ove klade bili su kontinenti i ostrva odvojena morem što je moglo da omogući alopatričku specijaciju između klada. Klada *S. equinum* „ugnezdila“ se među ovim kladama, što čini široko rasprostranjeni takson *S. pseudequinum* parafiletским. Iako nikada ranije nije testiran, Cherairia i sar. (2014) sugerišu da bi *S. pseudequinum* mogao biti kompleks vrsta zbog svojih raznovrsnih staništa i širokog geografskog rasprostranjenja. Vrsta *S. pseudequinum* je prvobitno opisana sa Kanarskih ostrva (Segui, 1921) koja su geografski najbliža poreklu uzoraka *S. pseudequinum* W2. Stoga bi sekvence iz populacije sa Kanarskih ostrva bile od najveće važnosti u rešavanju nomenklature unutar *equinum* grane.

Kod morfo-vrste *S. pseudequinum*, neki autori su insistirali na prepoznavanju morfološki različitih podvrsta, kao što su *Wilhelmia mediterranea sulfuricola* i *W. m. fluminicola* (Rivosecchi, 1972, 1978). Početkom 20. veka opisana je nova vrsta iz Srbije, *S. brnizensis* Baranov, 1924, koja je kasnije sinonimizovana sa *S. pseudequinum*. Pretpostavka je da bi klada *S. pseudequinum* B mogla odgovarati *S. brnizensis*. Međutim, potrebno je uraditi dodatne morfološke, citogenetske i genetičke analize, koje bi uključivale i tipski primerak *S. pseudequinum* sa Kanarskih ostrva, kao i jedinki sa Balkana i Bliskog istoka da bi se rešili ovi problemi.

5.1.2. *Lineatum* grana

U prethodnim studijama (Petrova i sar., 2003; Chubareva i sar., 2007; Huang i sar., 2012; Adler i sar., 2015) uočene su sledeće kariološke karakteristike *lineatum* grane: prisutan hromocenter (čiji promenljivi obim je primećen kod različitih vrsta), prošireni region hromozoma I odsutan, a marker ispupčenja i Balbijanijev prsten nisu subterminalno pozicionirani na hromozomu IIS. Štaviše, kod vrsta *lineatum* grane primećen je veći inverzioni polimorfizam. U ovoj studiji uočene su tri monofiletske linije unutar *lineatum* grane. Liniju *sergenti* predstavlja jedna klada, linija *paraequinum* se sastoji od dve klade, dok je linija *lineatum* sastavljena od šest klada. Razlike između linija *paraequinum* i *lineatum* su opisane i u ranijim istraživanjima, a segregacija grupa je određena položajem Balbijanijevog prstena (bliže centromeri kod *S. paraequinum*) i veličinom hromocentra (Petrova i sar., 2003; Chubareva i sar., 2007; Adler i sar., 2015).

U okviru podroda *Wilhelmia*, linija *sergenti* je morfološki različita. Karakterišu je škrge lutaka sa samo četiri centralna filamenta: 2 spoljna filamenta su duga i čvrsta i 2 dorzalna filamenta su kratka i fleksibilna (Rubcov, 1956). Linija *sergenti* obuhvata dve morfološki definisane zapadnopalearktičke vrste, *S. sergenti* i *Simulium quadrifila* Grenier, Faure & Laurent, 1957, kao i

vrstu *Simulium xingyiense* Chen & Zhang, 1998 iz istočnog Palearktika. Iako vrsta nije kariološki ispitana, *S. xingyiense* je pokazala karakteristike slične drugim linijama grane *lineatum* (Huang i sar., 2012). Molekularne sekvence uključene u ovu studiju predstavljale su jednom kladom i vrstom *S. sergenti*, i otkrile su ogromnu divergenciju u odnosu na druge klade (41 korak mutacije u mreži haplotipova, raspon genetskih udaljenosti 12,12-16,13%).

Postojale su dve klade *S. paraequinum* u svim konstruisanim filogenetskim stablima. Razdvajanje ovih klada dogodilo se pre 23–11 miliona godina. Genetička varijabilnost među njima je relativno velika (5,10%), iako su uzorci sa geografski bliskih lokaliteta. Dva sintopska varijeteta (*Wilhelmia paraequina paraequina* Puri i *Wilhelmia paraequina transcaucasica* Rubzov) vrste *S. paraequinum* je prvi opisao Rubcov (1956) u Jermeniji. Ovi varijeteti su se razlikovali po veličini odraslih mušica i razlikama u morfologiji gonofurke. Petrova je 2003. godine opisala dve sintopske citoforme (citotip A i B) ove vrste iz Jermenije (Petrova, 2003), a Inci i sar. (2017) na osnovu mtDNK opisuju dve linije u Turskoj. Naše stablo pokazuje ranu divergenciju unutar *S. paraequinum*, što bi se moglo protumačiti kao postojanje dva taksona, moguće je podudaranje sa *S. paraequinumom* i *S. transcausicum*, po Rubcovu (1956). Usled nedostatka uzoraka vrste *S. lurestanicum* (Yankovsky, 2010) iz Irana, za koju Khazeni i sar. (2013) smatraju da je sinonim vrsti *S. paraequinum*, nije bilo moguće sugerisati identitet niti poziciju tog taksona.

U okviru *lineatum* linije, sestrinske vrste *S. lineatum*, *S. turgaicum* i *S. balcanicum* bile su prisutne sa po dve klade. Ovo je potvrđeno i rezultatima GMIC analize, prema kojima *lineatum* linija ima šest potencijalnih vrsta. Sve klade unutar *lineatum* linije imale su nisku genetičku udaljenost jedna od druge (1,78–3,30%), a filogenetski odnosi nekih klada na stablima su bili manje ubedljivi (BI<0,8). Inci i saradnici takođe su utvrdili nisku genetičku varijabilnost između vrsta *lineatum* linije (2,7–3,4%) (Inci i sar., 2017). Pokazalo se da su razdvajanja ovih klada nedavna, pri čemu je vreme najranije divergencije za *lineatum* kladu, pre približno 20–6 miliona godina, dok se vreme drugih divergencija u velikoj meri preklapalo. Samo unutar *lineatum* linije grane mreže haplotipova su se u velikoj meri preklapale, što dodatno izaziva sumnju da ove klade zaista predstavljaju različite vrste. Slična pozicija se dobija u BOLD sistemu gde svih šest klada odgovara jednom klasteru (BOLD: AAM4036).

Pomenute vrste nemaju pouzdane morfološke karakteristike po kojima bi se razlikovale. Prema nekim istraživanjima iz centralne Evrope morfološka razlika između *S. lineatum* i *S. balcanicum* je upitna, pogotovo kada su u pitanju adultne jedinke (Crosskey i Zwick, 2007; Jedlička i Seitz, 2008). U nekim identifikacionim ključevima, *S. turgaicum* karakteriše veća dužina prednjih filamenata škrge lutaka od *S. lineatum* (Rubtsov, 1956), međutim Adler i saradnici ovaj identifikacioni karakter ne smatraju adekvatnim i tvrde da se ove dve vrste morfološki ne razlikuju (Adler i sar., 2015). Dakle, među vrstama *lineatum* linije, jedini pouzdan morfološki karakter je prisustvo petiolatnog (račvastog) para škržnih filamenata kod *S. balcanicum* lutke (Rubtsov, 1956; Yankovsky, 2002; Lechthaler i Car, 2005; Jedlička i Seitz, 2008; Adler i sar., 2015). Primerici analizirani u ovoj studiji koji su morfološki identifikovani kao *S. balcanicum*, na osnovu račvastih škrge, pozicionirani su u dve različite klade filogenetskog stabla. Jedna klada (*S. balcanicum*) koja je uključivala preuzete sekvence i jedinke sa Balkana se sastojala od lutaka i larvi koje su nedvosmisleno identifikovane kao *S. balcanicum*. Drugu kladu (*S. balcanicum/turgaicum* 1) sačinjavale su sekvence balkanskih jedinki sa jasno vidljivim drškastim škragama (dakle, kao u *S. balcanicum*), ali i sekvence jedinki iz Turske koje su morfološki i citogenetički identifikovane kao *S. turgaicum* 1 (Inci i sar., 2017). Ovo bi trebalo da dovede u pitanje drške škrge kao pouzdanog morfološkog karaktera za razlikovanje morfo-vrsta *S. balcanicum* i *S. turgaicum*.

Adler i saradnici su u svojoj studiji prepoznali četiri (hromozomski) odvojene vrste iz *lineatum* linije (*S. balcanicum*, *S. lineatum*, *S. takahasii* i *S. turgaicum*) (Adler i sar., 2015). Sekvence vrste *S. takahasii* nisu dobijene, pa se ne može diskutovati o položaju ove vrste. Hromozomski odnosi druge tri vrste prema njima (*S. turgaicum* kao sestrinska vrsta vrstama *S. lineatum* i *S. balcanicum*) su u suprotnosti sa našim filogenetskim scenarijem. *Simulium balcanicum*

je veoma uniforman i ima određeni fiksirani karakter, inverziju u okviru hromozomske lokacije IL-14 (Adler i sar., 2015). Posmatrajući naš evolutivni scenarijo možemo pretpostaviti da je ista inverzija prisutna i u kladi *S. turgaicum* 1. Ako se ispostavi da je ovo tačna pretpostavka, inverzija IL-14 bi bila sinapomorfna karakteristika za klade *S. balcanicum*, *S. balcanicum/turgaicum* 1 i *S. turgaicum* 1. Potrebno je dalje istraživanje u okviru *S. turgaicum* 1 da bi se potvrdila ova mogućnost. Sekvence koje se nalaze rasute u *S. turgaicum* 1 i *S. balcanicum/turgaicum* 1 dobijene su iz studije Inci i sar. (2017), gde su i sami autori izneli sumnju u pouzdanost identifikacije unutar ove vrste. Klada *S. turgaicum* 2, koja bi se tada mogla videti kao „tipični“ *S. turgaicum* šire je rasprostranjena nego što se mislilo (prisutna je i na Balkanskom poluostrvu, ne samo u Anadoliji) i takođe bi je trebalo hromozomski istražiti da bi se proverile inverzije na IIL-8, IIL-11 i IIL-12 (Adler i sar., 2015). Dve poznate klade vrste *S. lineatum* se u velikoj meri preklapaju u distribuciji, pošto su sekvence iz obe klade pronađene na susednim lokalitetima. Ne postoje hromozomske razlike kod primeraka iz Engleske koje su proučavali Adler i saradnici (Adler i sar., 2015), gde su autori posmatrali sedam jedinki sa povezanim inverzijama u IS i u IIL. Možemo se složiti sa zaključkom Adlerom i saradnika (Adler i sar., 2015) da je za utvrđivanje postojanja kriptičnih taksona kod *S. lineatum* potrebno sakupiti dodatne uzorke.

Široke distribucije priznatih grupa vrsta unutar *lineatum* grane (zapadnopalearktički *sergenti*, *quadrifila* + istočnopalearktički *xingyiense*; zapadno/centralnopalearktički *lineatum*, *balcanicum*, *turgaicum* + istočnopalearktički *takahasii*) zahtevaju više uzorkovanja i proučavanje centralno palearktičkih vrsta kako bi se dobio kompletan scenario evolucije vrsta podroda *Wilhelmia*.

5.2. Genetička varijabilnost vrsta *Simulium reptans* i *S. reptantoides*

Filogenetske analize sekvenci iz uzoraka REPTANS grupe vrsta otkrile su prisustvo dve glavne grane sa četiri dobro istaknute klade. Dve grane predstavljaju prethodno definisane vrste, *S. reptans* i *S. reptantoides* (Edwards, 1920; Knoz, 1965; Day i sar., 2008). Varijabilnost između njih (7,38–7,94%) potvrdila je postojanje ove dve vrste. Prema dosadašnjim istraživanjima (Rivera i Currie, 2009; Hernandez-Triana i sar., 2012), genetičke divergencije kod simulida u rasponu od 2,83–15,33% sugerišu postojanje različitih vrsta, dok genetičke divergencije u rasponu od 0–3,84% sugeriše intraspecijske razlike.

Topologija stabala dobijena korišćenjem različitih metoda (ML, MP i Bajesovo stablo) pokazala je isti dobro podržan položaj glavnih klada. Položaji nekih linija unutar ovih klada su se razlikovali među ML, MP i Bajesovim filogenetskim stablima. Međutim, ove razlike nemaju visoku podršku i zbog toga ih treba dalje analizirati.

Svaka vrsta se sastojala od dve klade koje su predstavljale različite molekulske forme, A i B. Postojanje ovih formi opisali su Day i sar. (2008) i Kudela i sar. (2014), a u uzorcima sa Balkanskog poluostrva nisu definisane nove forme. Varijabilnost između klada za mtCOI sekvence ove dve forme kod *S. reptans* (2,31%) i *S. reptantoides* (1,43%) su bile nedovoljne da se smatraju zasebnim vrstama, međutim ove vrednosti ukazuju na visoku intraspecijsku varijabilnost kod obe vrste. Velika varijabilnost može biti povezana sa širokom distribucijom.

Prema poslednjoj ček listi, *S. reptans* je prisutan u nekim zemljama Balkana, uključujući Bosnu i Hercegovinu, Grčku, Severnu Makedoniju, Crnu Goru i Srbiju. Kudela i sar. (2014) su pokazali da se forma *S. reptans* A javlja samo u Velikoj Britaniji i Švedskoj, dok je *S. reptans* B, pored toga što je prisutan u UK i Švedskoj sa retkim nalazima, uglavnom rasprostranjen u centralnoj Evropi i na području Baltika. Rezultati ovih istraživanja otkrili su prisustvo forme *S. reptans* B i na Balkanu. Jedan haplotip (3B) pronađen je isključivo u balkanskim uzorcima (Hrvatska), dok je drugi (1B) pronađen kako u balkanskim uzorcima (Slovenija i Severna Makedonija) tako i u Slovačkoj i Litvaniji. Potvrđena je niska varijabilnost kod *S. reptans* A forme

(sa samo dva prisutna haplotipa i samo jednom mutacionom razlikom između njih) i njegovu ograničenu distribuciju u zapadnoj i severnoj Evropi. Prema dobijenim rezultatima i uključivanjem svih uzoraka sa Balkanskog poluostrva, pokazalo se da *S. reptans* B forma ima širu rasprostranjenost nego što je ranije bilo poznato.

Simulium reptantoides je prvobitno opisao Carlsson iz neodređene evropske zemlje, pa je stoga njen tipski lokalitet nepoznat (Adler i Crosskey, 2019). Vrsta je naknadno potvrđena u Britaniji i Slovačkoj (Kudela i sar., 2014). Iako postoje retki i sporadični nalazi vrste *S. reptantoides*, oni su uglavnom ograničeni na područje severnog Balkana, reke Dunav i Savu u Hrvatskoj (Ivković i sar., 2016) i sistem odvodnjavanja Dunava (Jedlička i Seitz, 2008). U studiji Kudela i sar. (2014), *S. reptantoides* je bio ograničen na Veliku Britaniju (pretežno A forma) i centralnu Evropu (pretežno B forma). Istraživanje je pokazalo ujednačenu distribuciju obe forme širom Evrope, od Velike Britanije, preko Slovačke, do Balkanskog poluostrva (Slovenija, Srbija, Bosna i Hercegovina, Crna Gora i Bugarska). Obe forme nalažena su u sintopiji, preklapajući se u svim životnim fazama. Diverzitet haplotipova je bio veći od onog uočenog kod *S. reptans*. Kada se posmatra klada *S. reptantoides* A, predstavnici sa Balkanskog poluostrva pozicionirali su se u korenu klade kao najranije odvojeni. Predstavnici *S. reptantoides* B sa Balkana izmešani su sa jedinkama B forme poreklom iz drugih područja Evrope. Ovo ukazuje na značaj Balkanskog poluostrva kao potencijalnog mesta porekla klade A i kao mesta visokog genetičkog diverziteta simulida.

5.3. Distribucija simulida na Balkanu i njihove ekološke preference

Rezultati dobijeni u genetičkim analizama vrsta podroda *Wilhemia* i dveju vrsta *S. reptans* i *S. reptantoides*, a odnose se na veliku genetičku varijabilnost vrsta, kao i brojni literaturni podaci sa sličnim rezultatima, navode na zaključak da su morfološki identifikovane vrste upitne kao validni taksoni, kao i da je identifikacija teška a često i nepouzdana usled veoma male morfološke varijabilnosti. Iz tog razloga, distribucije simulida, ekološke preference i biodiverzitet analizirani su na morfološki identifikovanim vrstama ali i na grupama taksona (grupama vrsta, podrodovima i rodovima) kako bismo umanjili greške potencijalno pogrešne identifikacije.

Ček liste (Adler, 2022) navode prisustvo 70 vrsta (Tabela 1) a tokom ovog istraživanja na području Balkanskog poluostrva zabeleženo je prisustvo 41 vrste iz familije Simuliidae. Vrste koje nisu nađene tokom ovog istraživanja retko su beležene i od strane drugih istraživača na ovim prostorima te je neophodno usmereno istraživanje kako bi se njihovo prisustvo potvrdilo. Izuzetak je golubačka mušica (*S. colombaschense*) koja je zbog svog značaja najčešće istaživana vrsta na ovim prostorima. Brojnost populacija ove vrste se značajno smanjila nakon izgradnje hidroelektrana Đerdap I i II, što je dovelo do drastičnog uspora vode i promena uslova na staništu (Živković, 1975).

Analizom zajednica simulida praćena je njihova distribucija u različitim tipovima vodotoka, koji se nalaze na različitim nadmorskim visinama, pripadaju različitim slivovima ili hidroekoregionima. Kada se posmatraju nadmorske visine na kojima su zajednice simulida zabeležene, više od 50% vrsta prisutno je na svim nadmorskim visinama, što ukazuje na njihovu eurivaletnost. Vrste *Simulium maculatum*, *S. xanthinum*, *S. noelleri*, *S. angustitarse*, *S. rubzovianum*, *S. turgaicum*, *S. paraequinum*, *S. petricolum* i *S. aureum* nalažene su isključivo na nadmorskim visinama do 500 m, dok je vrsta *S. brevidens* nađena samo na lokalitetima preko 800 m nadmorske visine. Široko rasprostranjenje po nadmorskim visinama (0–1000 m) ispoljile su vrste *S. balcanicum*, *S. equinum*, *S. erythrocephalum*, *S. pseudequinum* i *S. reptantoides* sa ekološkim optimumom oko 300 m. Vrste *S. ornatum* i *S. reptans* se odlikuju širom ekološkom nišom (0–1200 m nadmorske visine) sa optimumom oko 400 m, a najširu ekološku valencu u odnosu na

nadmorsku visinu pokazale su vrste *Simulium variegatum* i *Prosimulium tomosvaryi*. Njihovo prisustvo zabeleženo je na nadmorskim visinama od 0 do 1400 m, sa ekološkim optimumom oko 600 m. Prema Živković na prostoru Balkana vrsta *S. ornatum* poseduje veoma široku ekološku valencu, u odnosu na nadmorsku visinu prisutna je na svim visinama do 1000 m (Živković, 1961), dok Ignjatović-Ćupina beleži pojavu *S. ornatum* u Vojvodini na nadmorskim visinama od 82 do 258 m (Ignjatović-Ćupina, 2011). Vrsta *S. erythrocephalum* je na ovim prostorima uglavnom vezivana za nizijske reke (Baranov, 1942; Živković, 1967b; Ignjatović-Ćupina, 2011), međutim tokom ovog istraživanja zabeleženo je njeno prisustvo i na visinama od 1000 m. Vrste *S. ornatum*, *S. reptans*, *S. erythrocephalum* prisutne su na različitim nadmorskim visinama i širom Evrope. Na području centralne i severne Evrope vrste *S. ornatum* i *S. reptans* nalažene su na nadmorskim visinama od 3 m do 1000 m (Rivosecchi, 1971; Jedlička, 1978; Olejniček, 1982; Seitz, 1994; Malmqvist i sar., 1999; Ofenböck i sar., 2002, Illéšová i sar., 2008), dok je *S. erythrocephalum* registrovana na visinama od 100 m do 800 m (Olejniček, 1982; Ofenböck i sar., 2002; Illéšová i sar., 2008). Vrste *S. balcanicum* i *S. equinum* u Evropi se nalaze u nizijskim rekama, do 600 m nadmorske visine (Rivosecchi, 1971; Jedlička, 1978; Olejniček, 1982; Seitz, 1994; Malmqvist i sar., 1999; Ofenböck i sar., 2002; Illéšová i sar., 2008). Detaljniju distribuciju vrsta prema nadmorskim visinama, sa njihovim ekološkim optimumima, daju Ofenböck i saradnici. (Ofenböck i sar., 2002), koji smatraju vrste *S. ornatum* (complex) i *S. reptans* sveprisutnim, s obzirom da se javljaju na visinama do 1500 m, s tim da je ekološki optimum *S. ornatum* od 200 m do 500 m, a *S. reptans* od 200 m do 800 m. Vrsta *S. erythrocephalum* se može naći do 800 m, a *S. balcanicum* do 500 m, s tim da su obe vrste najčešće na visinama do 200 m. Svi ovi podaci ukazuju na preklapanje ovih vrsta duž visinskog gradijenta, sa blagim pomeranjima ekološkog optimuma što se uočilo i tokom ovog istraživanja. Ofenböck i saradnici navode *P. tomosvaryi* i *S. argyreatum* kao jedine dve vrste koje naseljavaju reke preko celog visinskog gradijenta, javljaju se na svim nadmorskim visinama (Ofenböck i sar., 2002). Pored njih, iznad 1500 m nadmorske visine, registrovali i vrste *P. hirtipes*, *P. rufipes* i *S. tuberosum*. Vrste *S. balcanicum*, *S. lineatum*, *S. equinum*, *S. pseudequinum*, *S. erythrocephalum*, *S. latipes*, *S. lundstromi*, *S. rostratum*, *S. angustipes*, *S. angustitarse* i *S. aureum*, pokazale najveće frekvence nalaženja ispod 200 m, dok se vrsta *S. latipes* nalazi isključivo u nizijskim rekama (Ofenböck i sar., 2002).

Ukoliko se posmatraju ekološki optimumi grupa vrsta dobijeni tokom ovih istraživanja, uočava se da EQUINUM grupa ima optimum oko 300 m nadmorske visine, REPTANS i ORNATUM oko 400 m a VARIEGATUM oko 600 m, što se podudara sa ekološkim optimumima pojedinačnih vrsta unutar grupe.

Ukoliko se posmatra distribucija simulida u različitim tipovima vodotoka, ovo istraživanje pokazuje da se vrsta *S. brevidens* beleži samo u izvorišnim regionima reka i potoka (T4), a *P. hirtipes* samo u malim rekama (T3). Vrste *S. ornatum*, *S. balcanicum*, *S. erythrocephalum* i grupe vrsta *S. reptans* i *S. variegatum* zabeležene su u svim tipovima vodotoka i mogu se smatrati eurivalentnim, s tim da vrste *S. ornatum*, *S. reptantoides*, *S. variegatum* i *P. tomosvaryi* dominiraju u tipu 3 vodotoka a *S. reptans*, *S. balcanicum* i *S. erythrocephalum* u tipu 2. Najveću ekološku tolerancu, po pitanju tipa vodotoka, pokazale su vrste *S. reptans* i *S. balcanicum*, što je potvrđeno i radovima drugih autora koji su obe vrste pronalazili kako u velikim ravničarskim rekama kao što je Dunav (Živković, 1967b; Ignjatović-Ćupina, 2011), tako i u malim brdsko-planinskim potocima (Seitz, 1994; Ofenböck i sar., 2002; Illéšová i sar. 2008). Analizirajući zajednice simulida Karpatskih reka u Slovačkoj, Illešová i saradnici su pokazali da je vrsta *Prosimulium rufipes* indikatorska za potoke, dok je *Simulium lineatum* vrsta karakteristična za reke (Illešová i sar., 2008). Prema njima, vrste *Simulium argyreatum*, *P. rufipes* i *S. cryophilum* su indikatorske vrste epiritralnih planinskih potoka, dok je *Simulium variegatum* karakteristična za metaritalne subplaninske potoke. Vrste *S. monticola*, i *P. hirtipes* dominiraju u subplaninskim i brdskim rekama. Vrste *S. ornatum* i *S. reptans* javljaju se kao indikatorske u subplaninskim rekama koje po zonalnosti pripadaju gornjem hiporitalu, a *S. equinum* brdskim rekama koje pripadaju donjem hiporitalu. Illešová i saradnici

vrstu *Simulium erythrocephalum* navode kao indikatorsku za ravničarske reke (epipotamal) (Ilešova i sar., 2008). Ovo istraživanje pokazuje isti obrazac distribucije vrsta (Slika 10, poglavlje 3.1.). I drugi autori dolaze do sličnih zaključaka. Tako je Seitz (1992) izdvojio vrste *S. costatum*, *S. naturale* Davies, 1966, *S. variegatum* i *S. reptans* kao vrste koje preferiraju planinske potoke i male reke. Werner (2003) navodi vrste *P. hirtipes* i *S. monticola* kao tipične predstavnike izvorišnog regiona, a Lautenschlager i Kiel (2005) takođe navode *P. hirtipes* i *S. argireatum*, kao vrste karakteristične za izvorišne delove toka.

Ukoliko se posmatra preferenca grupa vrsta prema tipu vodotoka EQUINUM i REPTANS preferiraju velike i srednje reke sa bržim i turbulentijim kretanjem vode i krupnijim supstratom (T2), dok ORNATUM i VARIEGATUM preferiraju manje vodotoke sa bržim tokom (T3, T4).

Distribucija simulida prema slivu kojem pripadaju vodotoci u kojima je zabeleženo njihovo prisustvo, ne pokazuju jasnu diferencijaciju. Većina lokaliteta koji pripadaju Jadranskom, Crnomorskom i Egejskom slivu pozicionirana je relativno blisko na istraživanom području (Srbija, Crna Gora, Bosna i Hercegovina, Severna Makedonija) pa samim tim vrste simulida nisu pokazale izraženu diferencijaciju prema pojedinačnim slivovima. Od ostalih vrsta simulida odvajaju se *S. petricolum* i *S. xanthinum* čije je prisustvo zabeleženo samo u rekama koje pripadaju Jonskom slivu.

Ukoliko se posmatra distribucija simulida prema hidroekoregionima rezultati ovog istraživanja pokazuju da su vrste *S. morsitans*, *S. angustitarse*, *S. intermedinum*, *S. turgaicum*, *S. paraequinum*, *S. vulgare*, *S. brevidens*, i *P. hirtipes* dominantne u hidrekoregionu ER5 (Dinarski Zapadni Balkan). ER6 (Grčki Zapadni Balkan) karakterišu vrste *S. xanthinum*, *S. rubzovianum* i *S. petricolum*, dok ER7 (Istočni Balkan) karakterišu vrste *S. auricoma*, *S. aureum*, *S. tuberosum*. Hidroekoregioni ER4, ER10 i ER11 nisu bili pokriveni adekvatnim brojem uzoraka da bi nešto više o njima moglo da se zaključi. Vrste podroda *Wilhelmia*, VARIEGATUM, ORNATUM i REPTANS grupe vrsta, kao i vrste *S. degrangei*, *S. argenteostriatum* i *S. erythrocephalum* su se pojavile u svim hidroekoregionima i pokazale vrlo širok areal rasprostranjenja. Ovi rezultati pokazuju odstupanja od nekih prethodnih istraživanja. Feld i saradnici, kao i Ofenböck i saradnici, proučavali su zajednice simulida u različitim ekoregionima i bioregionima definisanim po Illies, 1978 (Feld i sar., 2002; Ofenböck i sar., 2002). Tako, Ofenböck i saradnici navode da su vrste *S. argyreatum*, *S. variegatum*, *S. reptans*, *S. ornatum*, *S. monticola* i *P. hirtipes* bile sveprisutne u skoro svim bioregionima (Ofenböck i sar., 2002). Vrste *S. auricoma*, *S. bezzii*, *S. vulgare*, *S. bertrandi* Grenier & Dorier 1959, *S. carpathicum* Knoz, 1961 i *S. codreanui* (Sherban, 1958) su zabeležili samo u Alpima (ER4), dok su vrste *S. balcanicum*, *S. pseudequinum*, *S. ibariense* Zivkovitch i Grenier, 1959 i *S. latipes* (Meigen, 1804) prema Ofenböck i saradnicima prisutne samo u ER11, odnosno regionu mađarske ravnice (Ofenböck i sar., 2002). Rezultati ove studije se razlikuju u odnosu na navode Ofenböck i saradnika (Ofenböck i sar., 2002) u tome što su vrste *S. pseudequinum* i *S. balcanicum* zabeležene u svim hidroekoregionima Balkana, pa možemo zaključiti da nisu vezane samo za ER11.

Alpski hidroekoregion (ER4) karakterišu grupe vrsta HIRTIPES i MERIDIONALE. Podrod NEVERMANNIA i grupe vrsta VERNUM i ORNATUM određuju ER5. EQUINUM grupa vrsta karakteristična je za ER6 i ER11, dok grupe vrsta BOOPHTHORA i EQUINUM i podrod EUSIMULIUM karakterišu ER7. Za ER10 karakteristične su grupe vrsta BUKOVSKII i VENUSTUM.

Pored činjenice da vrste pokazuju jasne preference po nadmorskim visinama i tipu vodotoka, sličnu ekološku diferencijaciju pokazuju i grupe vrsta (Prilog 5, 6). Stoga se može razmatrati upotreba grupa vrsta kao operativnih taksonomskih jedinica u studijama procena ekološkog statusa i tipologije vodenih ekosistema, u slučaju kada identifikaciju nije moguće izvršiti do najnižeg taksonomskog nivoa.

5.4. Diverzitet simulida na Balkanskom poluostrvu

Najveći diverzitet simulida na istraživanom području zabeležen je u velikim i srednjim rekama (T2), i u manjim vodotocima (T3) na nadmorskim visinama od 500 do 800 m. Obe ove kategorije karakteriše krupnija podloga i veća brzina toka. Veliki diverzitet simulida u manjim rekama potvrdila su i ranija istraživanja (Seitz, 1992; Feld i sar., 2002; Ofenböck i sar., 2002). Velike ravničarske reke (T1) karakterisao je relativno nizak diverzitet zajednice simulida. Variranje broja zabeleženih vrsta između različitih morskih slivova i hidroekoregiona može se pripisati razlici u broju istaženih lokaliteta i prikupljenih uzoraka simulida, što ukazuje da je neophodno istražiti dovoljan broj lokaliteta kako bi se pouzdano govorilo o diverzitetu nekog područja.

Sve ispitivane grupe zajednica simulida, koje se beleže u vodotocima na različitim nadmorskim visinama, koji pripadaju različitim tipovima, slivovima i hidroekoregionima, pokazuju visok *beta* diverzitet koji se ogleda u visokim vrednostima zamene vrsta i niskim vrednost ugnjeđenosti. Izražen odnos komponenti *beta* diverziteta posledica je velikog broja istraženih lokaliteta sa širokim opsegom ekoloških uslova i bogatstvom odgovarajućih mikrostaništa, koji su omogućili prisustvo velikog broja različitih vrsta simulida. Analize diverziteta ove grupe navode na zaključak da iako su široko rasprostranjene i morfološki slične, različite vrste simulida traže različita mikrostaništa pogodna za obavljanje svog životnog ciklusa.

5.4.1. Biodiverzitet vrsta podroda *Wilhelmia* na Balkanskom poluostrvu

Na Balkanskom poluostrvu je prisutno šest vrsta podroda *Wilhelmia* prema ček listama koje su dali Adler i Crosskey (2018), što predstavlja 60% vrsta zabeleženih u Evropi *S. balcanicum*, *S. lineatum*, *S. paraequinum*, *S. equinum*, *S. pseudequinum* i *S. angustifurca*. Iako se Balkansko poluostrvo smatra jednim od žarišta biodiverziteta južne Evrope, u poređenju sa okolnim regionima ne ističe se bogatstvom vrsta iz podroda *Wilhelmia*. U centralnoj Evropi prisutno je šest, u Anadoliji i na Kavkazu po sedam vrsta (Adler i Crosskey, 2018). Budući da se kontinuirano otkriva značajan kriptični diverzitet unutar podroda *Wilhelmia*, bogatstvo taksona na području Balkana moglo bi biti prilično drugačije.

Barkodiranjem vrsta podroda *Wilhelmia* uočeno je prisustvo sedam klada (potencijalnih vrsta) na proučavanom području Balkana. Morfo-vrste *S. equinum*, *S. pseudequinum*, *S. paraequinum*, *S. lineatum* i *S. turgaicum*, bile su predstavljene po jednom kladom (*S. equinum*, *S. pseudequinum* B, *S. paraequinum* 1, *S. lineatum* 2 i *S. turgaicum* 2). Jedinke koje su na osnovu morfoloških karakterata identifikovane kao *S. balcanicum* izdvojile su se u dve klade: *S. balcanicum* i *S. balcanicum/turgaicum* 1. Klade *S. balcanicum*, *S. pseudequinum* B i *S. equinum* su široko distribuirane na Balkanu.

Adler i saradnici navode da se tri morfo-vrste *lineatum* linije (*S. balcanicum*, *S. lineatum* i *S. turgaicum*) razlikuju se po svojoj distribuciji (Adler i sar., 2015). Široko rasprostranjena vrsta *S. balcanicum* širi svoj areal distribucije prema istoku. Vrsta *S. lineatum* prisutna je širom Evrope i njena istočna granica je na Balkanu, u Bugarskoj, dok ju je na Bliskom istoku zamenila *S. turgaicum*. Adler i sar. (2015) su pretpostavili da je moguće preklapanje distribucije *S. lineatum* i *S. turgaicum*, potencijalno negde u južnoj Rusiji ili na Balkanu, možda u Bugarskoj. Isti autori su istakli neke od ekoloških razlika između ovih taksona, *S. lineatum* je nizijska vrsta, prisutna ispod 500 m, a *S. turgaicum* se javlja iznad 900 m. Takođe, kada se *S. balcanicum* i *S. lineatum* geografski preklapaju, obično se javljaju u različitim rekama (Adler i sar., 2015). Vrsta *S. turgaicum* (sekvence iz klade *S. turgaicum* 2) je prvi put zabeležena na Balkanu tokom ovog istraživanja. Nove sekvence vrsta podroda *Wilhelmia* sa Balkanskog poluostrva pokazale su da se sve tri vrste (*S. balcanicum*, *S. lineatum* i *S. turgaicum*) mogu naći u simpatriji, što je potvrđeno

uzorcima iz reke Save u Sloveniji. Ovi nalazi su pokazali da se zapadna granica rasprostranjenosti *S. turgaicum* prostirala daleko više ka zapadu, dok je zapadni deo Balkanskog poluostrva zaista viđen kao jugoistočna granica rasprostranjenja vrste *S. lineatum*.

Jedan od najzanimljivijih rezultata ovog istraživanja bila je geografska diferencijacija kod parafiletskih morfo-vrsta *S. pseudequinum*. Pošto je do divergencije njegovih klada došlo tokom oligocena, svaki od njih je mogao biti endemičan za svoju oblast porekla. Dakle, ako se pokaže tačnim, *S. pseudequinum* B bi bio endem Balkanskog poluostrva. Potrebne su dalje molekularne studije u oblastima potencijalnog kontakta između klada *S. pseudequinum* da bi se bolje tumačile njihove distribucije i evoluciona istorija.

5.4.2. Biodiverzitet vrsta *S. reptans* i *S. reptantoides* na Balkanskom poluostrvu

Upotrebom molekularnih tehnika, potvrđeno je prisustvo vrste *S. reptans* širom Balkana i zaključeno je da je vrsta *S. reptantoides* šire rasprostranjena i da ima veću učestalost pojavljivanja na Balkanu od vrste *S. reptans*. U poređenju sa prethodnim studijama (Day i sar., 2008; Bernotienė i Stunžėnas, 2009; Kudela i sar., 2014), ustanovljena je šira distribucija za obe vrste. Genetička varijabilnost vrsta *S. reptans* i *S. reptantoides* sugeriše postojanje različitih formi (A i B). Ovo istraživanje je pokazalo da je na Balkanu prisutna samo jedana forma *S. reptans* (forma B), dok se *S. reptantoides* javlja u obe forme (A i B). Prisustvo vrste *S. reptantoides* na Balkanskom poluostrvu ukazuje da su neki prethodni nalazi pogrešno identifikovani ili sinonimizovani. Potrebne su dalje analize kako bi se precizno razgraničila distribucija ove vrste i objasnila visoka intraspecijska varijabilnost.

Značaj genetičkih analiza tokom ove studije je pre svega u otkivanju „skrivenog“ diverziteta unutar čitave familije Simuliidae na Balkanskom poluostrvu. Kako bi se upotpunile informacije o diverzitetu simulida na Balkanu neophodno je uraditi genetičke analize i drugih grupa vrsta, podrodova i rodova u okviru familije. Neophodna su i detaljnija istraživanja retkih vrsta čije se prisustvo navodi na ovom području, ali nisu zabeležene tokom ove studije.

ZAKLJUČCI

ZAKLJUČCI

Najvažniji zaključci iz istraživanja na temu „Diverzitet i genetička varijabilnost familije Simuliidae (Insecta: Diptera) na području Balkanskog poluostrva“ su:

- Fauna simulida na istraživanom području je bogata i predstavljena sa najmanje 46 takona.
- Najčešće nalažena, a ujedno i najbrojnija vrsta je vrsta *Simulium ornatum*, a prate je *Simulium reptans*, *Simulium variegatum* i *Simulium balcanicum*.
- U okviru podroda *Wilhelmia* koji je predstavljen sa 7 morfološki identifikovanih vrsta, otkriveno je prisustvo 15 monofiletskih klada (potencijalnih vrsta), od čega je 7 prisutno na Balkanskom poluostrvu.
- Morfo-vrsta *Simulium pseudequinum* predstavljena je sa četiri klade, potencijalne vrste. Do njihovog razdvajanja došlo je potencijalnom alopatričkom specijacijom tokom oligocena, te bi svaka od njih mogla biti endemična za svoju oblast porekla.
- Vrsta *Simulium pseudequinum* B bi bila endemit Balkanskog poluostrva i mogla bi odgovarati ranije opisanoj vrsti *Simulium brnizense*.
- Vrsta *Simulium turgaicum* je prvi put zabeležena na Balkanskom poluostrvu, što ukazuje na to da je zapadna granica njenog areala rasprostranjenja šira i uključuje Balkan.
- Vrste *Simulium balcanicum*, *Simulium lineatum* i *Simulium turgaicum* mogu da se nađu u simpatriji, što je potvrđeno nalazima iz reke Save u Sloveniji.
- Filogenetske analize su pokazale prisustvo vrsta *Simulium reptans* (forma B) i *Simulium reptantoides* (forme A i B), iz REPTANS grupe vrsta, na Balkanskom poluostrvu, koje bi moglo predstavljati mesto porekla forme A vrste *Simulium reptantoides*.
- *Simulium reptantoides* je šire rasprostranjena i ima veću učestalost pojavljivanja na Balkanu od vrste *Simulium reptans*.
- Većina vrsta simulida je eurivalentna po pitanju nadmorske visine. Vrsta *Simulium brevidens* je stenovalentna za izvorišne regione na nadmorskoj visini preko 800 m. Vrsta *Prosimulium hirtipes* je karakteristična za male reke, koje odlikuje brz tok i krupan supstrat.
- Široki areal rasprostranjanja na Balkanu ustanovljen je za vrste podroda *Wilhelmia*, grupe vrsta VARIEGATUM, ORNATUM i REPTANS, kao i za vrste *Simulium degrangei*, *Simulium argenteostriatum* i *Simulium erythrocephalum*.
- Slične ekološke preference pokazuju pojedinačne vrste i grupe vrsta, te se u slučaju kada identifikaciju nije moguće izvršiti do nivoa vrste, grupe vrsta mogu koristiti kao operativne taksonomske jedinice u studijama procene ekološkog statusa i tipologije vodenih ekosistema.

LITERATURA

- Abdelnur, O.M. (1968). The biology of some black flies (Diptera: Simuliidae) of Alberta. *Quaestiones entomologicae* 4(3):113–174.
- Adler, P.H. & Crosskey, R.W. (2009). World blackflies (Diptera: Simuliidae): A comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory. 109 pp.
- Adler, P.H. & Crosskey, R.W. (2012). World blackflies (Diptera: Simuliidae): A comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory. 109 pp.
- Adler, P.H. & Crosskey, R.W. (2015). Cytotaxonomy of the Simuliidae (Diptera): a systematic and bibliographic conspectus. *Zootaxa*, 3975(1), 139.
- Adler, P.H. & Crosskey, R.W. (2018). World blackflies (Diptera: Simuliidae): A comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory. 109 pp.
- Adler, P.H. & Crosskey, R.W. (2019). World blackflies (Diptera: Simuliidae): A comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory. 109 pp.
- Adler, P.H. (2022). World blackflies (Diptera: Simuliidae): A comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory. 109 pp.
- Adler, P.H., Cheke, R.A. & Post, R.J. (2010). Evolution, epidemiology, and population genetics of black flies (Diptera: Simuliidae). *Infection, Genetics and Evolution*, 10(7), 846-865.
- Adler, P.H., Currie, D.C., Wood, D.M., Idema, R.M. & Zettler, L.W. (2004). *The black flies (Simuliidae) of North America* (p. 941). New York City, New York: Comstock Pub. Associates.
- Adler, P.H., Inci, A., Yildirim, A., Duzlu, O., McCreadie, J.W., Kúdela, M., Khazeni, A., Brúderová, T., Seitz, G., Takaoka, H., Otsuka Y. & Bass, J. (2015). Are black flies of the subgenus *Wilhelmia* (Diptera: Simuliidae) multiple species or a single geographical generalist? Insights from the macrogenome. *Biological Journal of the Linnean Society*, 114(1), 163-183.
- Adler, P.H., Kúdelová, T., Kúdela, M., Seitz, G. & Ignjatović-Ćupina, A. (2016). Cryptic biodiversity and the origins of pest status revealed in the macrogenome of *Simulium colombaschense* (Diptera: Simuliidae), history's most destructive black fly. *PLoS One*, 11(1), e0147673.
- An, Y., Li, C., Li, J. & Wang, Y. (2022). The complete mitochondrial genome of *Simulium jisigouense* (Diptera, Simuliidae) and phylogenetic analysis of Simuliidae. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 731.
- Aqem Consortium (2002). Manual for the application of the AQEM system. A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive v1.2.
- Babić, J., Baranov, N. & Ganslmayer, R. (1935). Die Kolumbatscher Mücke im Jahre 1934. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 69(3), 205-212.
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16, 37-48.
- Baranov, N. (1926), u originalu - Baranoff, N. (1926). Über die serbischen Simuliiden. *Neue Beitritte zur systematischen Insektenkunde*, 3(19-20), 183-194.
- Baranov, N. (1942). *Boophthora argyreata* Mg. u okolini Zagreba. *Veterinarskim arhiv, Zagreb*, 7(5), 209-211.
- Barr, W.B. (1982). Attachment and Silk of Larvae of *Simulium vittatum* Zetterstedt (Diptera: Simuliidae), M.Sc. thesis, University of Alberta, Edmonton.
- Baselga, A. (2010). Partitioning the turnover and nestedness components of beta diversity. *Global ecology and biogeography*, 19(1), 134-143.

- Bernotienė, R. & Stunžėnas, V. (2009). On the biology of *Simulium galeratum* in LIT: ecological and molecular data. *Ekologija*, 55(2), 123–126.
- Bertone, M.A., Courtney, G.W. & Wiegmann, B.M. (2008). Phylogenetics and temporal diversification of the earliest true flies (Insecta: Diptera) based on multiple nuclear genes. *Systematic Entomology*, 33(4), 668-687.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C. H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A. & Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 10(4), e1003537.
- Bray, J.H. & Maxwell, S.E. (1985). *Multivariate Analysis of Variance v54*. Thousand Oaks, CA: Sage.
- Cherairia, M., Adler, P.H. & Samraoui, B. (2014). Biodiversity and bionomics of the black flies (Diptera: Simuliidae) of northeastern Algeria. *Zootaxa*, 3796(1), 166-174.
- Chubareva, L.A., Petrova, N.A. & Reva, M.V. (2007). Karyotypic and morphological study of five species of the genus *Wilhelmia* Enderlein (Diptera, Simuliidae). *Entomological Review*, 87, 1290-1299.
- Ciurea, T. & Dinulescu, G. (1924). Ravages causes par la mouche de Goloubatz en Roumanie; ses attaques contre les animaux et contre l'homme. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 18(3), 323-342.
- Conflitti, I.M., Pruess, K.P., Cywinska, A., Powers, T.O. & Currie, D.C. (2013). DNA barcoding distinguishes pest species of the black fly genus *Cnephia* (Diptera: Simuliidae). *Journal of medical entomology*, 50(6), 1250-1260.
- Conflitti, I.M., Shields, G.F., Murphy, R.W. & Currie, D.C. (2017). Resolving evolutionary relationships in closely related nonmodel organisms: a case study using chromosomally distinct members of a black fly species complex. *Systematic Entomology*, 42(3), 489-508.
- Coudun, C. & Gégout, J.C. (2006). The derivation of species response curves with Gaussian logistic regression is sensitive to sampling intensity and curve characteristics. *Ecological modelling*, 199(2), 164-175.
- Craig, D.A. (1977). Mouthparts and feeding behaviour of Tahitian larval Simuliidae (Diptera: Nematocera). *Quaestiones Entomologicae*, 13, 195–218.
- Craig, D.A., Currie, D.C. & Joy, D.A. (2001). Geographical history of the central-western Pacific black fly subgenus *Inseliellum* (Diptera: Simuliidae: Simulium) based on a reconstructed phylogeny of the species, hot-spot archipelagoes and hydrological considerations. *Journal of Biogeography*, 28(9), 1101-1127.
- Crosskey, R.W. & Peterson, B.V. (1972). Simuliidae described by *N. baranov* and their types (Diptera). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology*, 27(3), 189-214.
- Crosskey, R.W. & Zwick, H. (2007). New faunal records, with taxonomic annotations, for the blackflies of TUR (Diptera, Simuliidae). *Aquatic Insects*, 29(1), 21-48.
- Crosskey, R.W. (1990). *The Natural History of Blackflies*. *The British Museum of Natural History*, London, UK. 711 pp.
- Crosskey, R.W. (2002). Second Update to the Taxonomic and Geographical Inventory of World Blackflies (Diptera: Simuliidae). *The Natural History Museum*. London. 14 pp.
- Currie, D.C. and Adler, P.H. (2008). Global diversity of black flies (Diptera: Simuliidae) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595, 469-475.
- Davies, D.M. & Peterson, B.V. (1957). Black flies over lakes (Simuliidae, Diptera). *Annals of the Entomological Society of America*, 50(5), 512-514.

- Day, J.C. (2008). Using molecular tools to differentiate closely related blackfly species of the genus *Simulium*. Environment Agency, Rio House, Waterside Drive, Aztec West, Almondsbury, Bristol. 1-33.
- Day, J.C., Goodall, T.I. & Post, R.J. (2008). Confirmation of the species status of the blackfly *Simulium galeratum* in Britain using molecular taxonomy. *Medical and veterinary entomology*, 22(1), 55-61.
- Day, J.C., Mustapha, M. & Post, R.J. (2010). The subgenus *Eusimulium* (Diptera: Simuliidae: *Simulium*) in Britain. *Aquatic Insects*, 32(4), 281-292.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*, 29(8), 1969-1973.
- Dudley, W. & Blair, W.F. (1992). *Aquatic Insects*. CAB International Wallington Oxon. 358 pp.
- Đuknić, J., Jovanović, V.M., Čanak Atlagić, J., Andjus, S., Paunović, M., Živić, I. & Popović, N. (2020). *Simulium reptans* (Linnaeus, 1758) and *Simulium reptantoides* Carlsson, 1962 from the Balkan Peninsula. *ZooKeys*, 922, 141-155.
- Đuknić, J., Jovanović, V.M., Popović, N., Živić, I., Raković, M., Čerba, D. & Paunović, M. (2019). Phylogeography of *Simulium* Subgenus *Wilhelmia* (Diptera: Simuliidae)—Insights From Balkan Populations. *Journal of medical entomology*, 56(4), 967-978.
- Edwards, F.W. (1920). On the British species of *Simulium*. II. The early stages; with corrections and additions to part I. *Bulletin of Entomological Research*, 11(3), 211-246.
- Feld, C.K., Kiel, E. & Lautenschläger, M. (2002). The indication of morphological degradation of streams and rivers using Simuliidae. *Limnologica*, 32(3), 273-288.
- 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.
- Forster, P., Torroni, A., Renfrew, C. & Röhl, A. (2001). Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Molecular biology and evolution*, 18(10), 1864-1881.
- Fu, Y.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-925.
- Fujisawa, T. & Barraclough, T.G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic biology*, 62(5), 707-724.
- Gíslason, G.M. & Steingrímsson, S.Ó. (2004). Seasonal and spatial variation in the diet of brown trout (*Salmo trutta* L.) in the subarctic River Laxá, North-East Iceland. *Aquatic Ecology*, 38, 263-270.
- Hendry, A.P., Bolnick, D.I., Berner, D. & Peichel, C.L. (2009). Along the speciation continuum in sticklebacks. *Journal of fish biology*, 75(8), 2000-2036.
- Hernandez-Triana, L.M., Crainey, J.L., Hall, A., Fatih, F., Mackenzie-Dodds, J., Shelley, A.J., Zhou, X., Post, R.J., Gregory, T.R. & Hebert, P. D.N. (2012). DNA barcodes reveal cryptic genetic diversity within the blackfly subgenus *Trichodagmia* Enderlein (Diptera: Simuliidae: *Simulium*) and related taxa in the New World. *Zootaxa*, 3514(1), 43-69.
- Hewitt, D. (1999). Arbitrary and necessary part 1: A way of viewing the mathematics curriculum. *For the learning of Mathematics*, 19(3), 2-9.
- Holmes, S. (2003). Bootstrapping phylogenetic trees: theory and methods. *Statistical Science*, 18(2), 241-255.

- Huang, L., Zhang, C., Jiang, Y. & Chen, H. (2012). Polytene chromosomes of *Simulium* (*Wilhelmia*) *xingyiense* (Diptera: Simuliidae) from China. *Acta Entomologica Sinica*, 55(8), 988-993.
- Ignjatović Čupina, A., (2011). Fauna Simulida (Diptera: Simuliidae) pribrežja fruške gore. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Ignjatović Čupina, A., Petrić, D., Konjević, A., Zgomba, M. & Marinković, D. (2005): Experiences in black fly research program in the region of Novi Sad (Serbia and Montenegro) and perspectives for control by application of *B.t.* The third Annual Meeting of the North American Black Fly Association. Lake Placid, Florida, USA. 5-7 February, 2005, *Abstracts Book*, 5-6.
- Ignjatović Čupina, A., Petrić, D., Zgomba, M., Konjević, A. & Grabovac, S. (2003). Distribution of some blackfly species (Diptera: Simuliidae) in the region of Novi Sad. *British Simuliid Group Bulletin* 21, 6–7.
- Ignjatović Čupina, A., Petrić, D., Zgomba, M., Konjević, A., Marinković, D. & Grabovac, S. (2006). Suppression of a *Simulium ornatum* Meigen 1818 (complex) biting risk to humans by larval control in the region of Novi Sad (Vojvodina Province, Serbia and Montenegro). 15th European SOVE meeting, Serres, Greece. 10-14 April, 2006. *Abstract Book*, 26.
- Illéšová, D., Halgoš, J., & Krno, I. J. (2008). Blackfly assemblages (Diptera, Simuliidae) of the Carpathian river: habitat characteristics, longitudinal zonation and eutrophication. *Hydrobiologia*, 598, 163-174.
- Illies, J. (1978). Limnofauna Europaea. Gustav Fisher Verlag. Stuttgart and New York, 532 pp.
- Ilmonen, J., Adler, P.H., Malmqvist, B. & Cywinska, A. (2009). The *Simulium vernum* group (Diptera: Simuliidae) in Europe: multiple character sets for assessing species status. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 156(4), 847-863.
- Inci, A., Yildirim, A., Duzlu, O., Onder, Z., Ciloglu, A., Seitz, G. & Adler, P. H. (2017). Genetic diversity and identification of Palearctic black flies in the subgenus *Wilhelmia* (Diptera: Simuliidae). *Journal of medical entomology*, 54(4), 888-894.
- Ivković, M., Kesić, M. & Stloukalová, V. (2012). Contribution to the knowledge of black fly (Diptera, Simuliidae) fauna at Plitvice lakes National Park. *Natura Croatica: Periodicum Musei Historiae Naturalis Croatici*, 21(1), 263-268.
- Ivković, M., Kúdela, M. & Kudelova, T. (2016). Blackflies (Diptera: Simuliidae) in Croatia: species richness, distribution and relationship to surrounding countries. *Zootaxa*, 4109(1), 16-30.
- Jaccard, P. (1912). The distribution of the flora in the alpine zone. 1. *New phytologist*, 11(2), 37-50.
- James, G., Witten, D., Hastie, T. & Tibshirani, R. (2013). An introduction to statistical learning. *Springer* 112.
- Jedlička, L. & Seitz, G. (2008). Black flies of the River Danube (Diptera, Simuliidae). *Lauterbornia*, 62, 93-119.
- Jedlicka, L. (1978). Distribution of *Odagmia ornata* (Meigen, 1818) and *Odagmia spinosa* (Doby et Deblock, 1957) in Slovakia (Diptera, Simuliidae). *Acta Facultatis Rerum Naturalium Universitatis Comenianae. Zoologia*, 23, 81-89.
- Jedlička, L., Kúdela, M. & Stloukalová, V. (2004). Key to the identification of blackfly pupae (Diptera: Simuliidae) of Central Europe. *Biologia*, 59(15), 157-178.
- Karadžić, B. (2013). FLORA: a software package for statistical analysis of ecological data. *Water Research and Management*, 3(2), 45-54.

- Kazmin, V.G. & Natapov, L.M. (1998). The paleogeographic atlas of northern Eurasia. Institute of Tectonics of the Lithospheric Plates, Russian Academy of Natural Sciences, Moscow, RU.
- Khazeni, A., Adler, P.H., Telmadareiiy, Z., Oshaghi, M.A., Vatandoost, H., Abtahi, S.M. & Lotfi, A. (2013). The black flies (Diptera: Simuliidae) of Iran. *Zootaxa*, 3694(1), 67-74.
- Knoz, J. (1965). To identification of Czechoslovakian black-flies (Diptera, Simuliidae). *Folia Facultatis Scientiarum Naturalium Universitatis Purkynianae Brunensis, Brno*, 6(5). 1-54.
- Kúdela, M., Bruderova, T., Jedlička, L., Bernotienė, R., Celec, P., & Szemes, T. (2014). The identity and genetic characterization of *Simulium reptans* (Diptera: Simuliidae) from central and northern Europe. *Zootaxa*, 3802(3), 301-317.
- Lautenschläger, M., & Kiel, E. (2005). Assessing morphological degradation in running waters using Blackfly communities (Diptera, Simuliidae): Can habitat quality be predicted from land use? *Limnologia*, 35(4), 262-273.
- Lechthaler, W. & Car, M. (2005). Simuliidae: key to larvae and pupae from central and western Europe. Riegersburg, Austria: eutaxa-Technisches Büro für Biologie.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- Mallet, J. (2008). Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1506), 2971-2986.
- Malmqvist, B., Zhang, Y. & Adler, P.H. (1999). Diversity, distribution and larval habitats of North Swedish blackflies (Diptera: Simuliidae). *Freshwater biology*, 42(2), 301-314.
- Moulton, J.K. (2000). Molecular sequence data resolves basal divergences within Simuliidae (Diptera). *Systematic Entomology*, 25(1), 95-113.
- Ofenböck, T., Moog, O. & Car, M. (2002). Do the Austrian blackfly fauna (Diptera: Simuliidae) support the typological approach of the EU water framework directive? *Limnologia*, 32(3), 255-272.
- Olejníček, J. (1982). Blackflies in the surroundings of Česke Budejovice. *Sbornik Jihoceske Muz Ceskych Budejovicich Prir Vedy*, 22, 59-70.
- Pascuzzo, C.M. (1976). Fecundity, Ovarian Development, and Physiological Age in Adult Black-flies (Simuliidae) with some Observations on Vertical Distribution (Doctoral dissertation).
- Paunović, M., Tubić, B., Kračun-Kolarević, M., Marković, V., Simić, V., Zorić, K., & Atanacković, A. (2012). Ecoregions delineation for the territory of Serbia. *Water Research and Management*, 2(1), 65-74.
- Petrić, D., Zgomba, M., Ignjatović-Ćupina, A., Konjević, A., Marinković, D. & Marković, I. (2006a). Impact of biolarviciding on *Simulium ornatum* Meigen 1818 (complex) populations and related biting risk. – In: Petrić D. & Ćurčić B. (ed): *On the Biology and Control of Blackflies*. - *Acta Entomologica Serbica, Supplement*, 2006: 141-154. Entomological Society of Serbia.
- Petrova, N.A., Chubareva, L.A., Adler, P.N. & Kachvoryan, E.A. (2003). Cytogenetic Features of Blackfly *Wilhelmia paraequina* Puri (Diptera: Simuliidae) from JER. *Russian Journal of Genetics*, 39(1), 41-50.
- Podani, J., Ricotta, C. & Schmera, D. (2013). A general framework for analyzing beta diversity, nestedness and related community-level phenomena based on abundance data. *Ecological Complexity*, 15, 52-61.

- Pons, J., Barraclough, T.G., Gomez-TURita, J., Cardoso, A., Duran, D.P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W.D. & Vogler, A.P. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic biology*, 55(4), 595-609.
- Pramual, P. & Nanork, P. (2012). Phylogenetic analysis based on multiple gene sequences revealing cryptic biodiversity in *Simulium multistriatum* group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Entomological Science*, 15(2), 202-213.
- QGIS.org[GIS software]. Version Quantum GIS (QGIS) 3.16.3-Hannover. QGIS Geographic Information System. QGIS Association. 2021. <http://www.qgis.org>
- Raković, M., Tomović, J., Popović, N., Pešić, V., Dmitrović, D., Stamenković, V.S., Hinić, J., Stefanovska, N., Lajtner, J. & Paunović, M. (2022). Gastropods in small water bodies of the Western Balkans-endangerments and threats. Springer Water, *Small Water Bodies of the Western Balkans*, 227-249.
- Rambaut, A. & Drummond, A. J. (2015). LogCombiner v1. 8.2. *LogCombiner* v1, 8, 656.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D. & Drummond, A. J. (2014). Tracer v1. 6.
- Rivera, J. & Currie, D. C. (2009). Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Molecular Ecology Resources*, 9, 224-236.
- Rivera, J.M. (2008). Utility of the cytochrome oxidase I (COI) for species identification and phylogeographic analysis in black flies (Diptera: Simuliidae) (Doctoral dissertation, Toronto, 97pp).
- Rivosecchi, L. (1971). Note biogeografiche sui Simulidi (Diptera: Nematocera), dei massicci montuosi dell'Appennino centrale (XX contributo alla conoscenza dei simulidi italiani). *Lavori della societa Italiana di biogeografia*, 2, 271-299.
- Rivosecchi, L. (1972). Contributo alla conoscenza dei Simulidi italiani. XXII. Raccolte dei simulidi adulti mediante trappole ad anidride carbonica. *Rivista di Parassitologia*, 33(4), 293-312.
- Rivosecchi, L. (1978). Fauna d'Italia XIII. Simuliidae (Diptera Nematocera). Edizioni Calderini, Bologna, 533 pp.
- Rothfels, K. H. (1979). Cytotaxonomy of black flies (Simuliidae). *Annual Review of Entomology*, 24(1), 507-539.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E. & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, 34(12), 3299-3302.
- Rubtsov, I.A. (1956). Blackflies (fam. Simuliidae) Fauna of the USSR. Akademii Nauk SSSR, Moscow and Leningrad. New Series, Insects, Diptera 6 (6), 859 pp.
- Ruiz-Arrondo, I., Hernández-Triana, L.M., Ignjatović-Ćupina, A., Nikolova, N., Garza-Hernández, J.A., Rodríguez-Pérez, M.A., Oteo, J.A., Fooks, A.R. & Lucientes Curdi, J. (2018). DNA barcoding of blackflies (Diptera: Simuliidae) as a tool for species identification and detection of hidden diversity in the eastern regions of Spain. *Parasites & vectors*, 11(1), 1-7.
- Schönbauer, J.A. (1795). Geschichte der schädlichen Kolumbatczer Mücken im Bannat, als ein Beytrag zur Naturgeschichte von Ungarn. *Patzowsky*, 8, 100.
- Schwarz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *The annals of statistics*, 461-464.
- Seitz, G. (1992). Verbreitung und Ökologie der Kriebelmücken (Diptera: Simuliidae) in Niederbayern. *Lauterbornia* 11, 1-231.
- Seitz, G. (1994). Neue und bemerkenswerte Kriebelmückenfunde (Diptera: Simuliidae) für die deutsche Fauna. *Lauterbornia*, 15, 101-109.

- Službeni Glasnik Republike Srbije br. 74/2011. Pravilnik o parametrima ekološkog i hemijskog statusa površinskih voda i parametrima hemijskog i kvantitativnog statusa podzemnih voda
- Sriphirom, P., Sopaladawan, P.N., Wongpakam, K. & Pramual, P. (2014). Molecular phylogeny of black flies in the *Simulium tuberosum* (Diptera: Simuliidae) species group in Thailand. *Genome*, 57(1), 45-55.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.
- Tamura, K. & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10(3), 512-526.
- Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9(4), 678-687.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipi, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Ter Braak, C.J. (1986). Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*, 67(5), 1167-1179.
- Tömösváry E. (1885) Die Kolumbaczer Mücke. Im Auftrage des Königl. ung. Ministeriums f. Ackerbau, Industrie und Handel verfasst. Ung. Weisskirchen
- Weber, E.A. & Grunewald, J. (1989). Cytotaxonomic differentiation of *Wilhelmia equina* (Linné, 1747) and *Wilhelmia lineata* (Meigen, 1804) (Diptera: Simuliidae). *Genome*, 32(4), 589-595.
- Werner, C. (2004). New records of Diptera predators of blackflies (Diptera, Simuliidae). *Entomologists monthly magazine*, 140, 1-25.
- Werner, D. & Pont, A.C. (2006). New results on Diptera predators in the blackfly plague areas of Central Europe and the Caucasus. *Acta entomologica serbica*, 4, 131-40.
- Werner, D. (2003). The Simuliidae (Diptera) of the River Oder and its tributaries, with special reference to the re-appearance of *Simulium (Schoenbaueria) nigrum* (Meigen) in larger rivers in Central Europe. *Journal of Natural History*, 37(12), 1509-1528.
- Werneré, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. Lectures on Mathematics in the Life Sciences. *American Mathematical Society*, 17, 57-86.
- Wotton, R.S. (1988). Dissolved organic material and trophic dynamics. *BioScience*, 38(3), 172-178.
- Yankovsky, A.V. (2002). A Key for the identification of blackflies (Diptera: Simuliidae) of Russia and adjacent countries (former USSR). Handbooks for the identification of the fauna of Russia published by Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, Sankt Petersburg. 170. 570 pp.
- Yankovsky, A.V. (2010). On the fauna of blackflies (Diptera: Simuliidae) of Iran. *Parazitologiya*, 44(2), 179-190.
- Zgomba, M., Petrić, D., Ignjatović Čupina, A., Konjević, A. & Marinković, D. (2004). Application of *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* in control of *Simulium ornatum* Meigen 1818 (complex) (Diptera: Simuliidae), the most abundant mammophilic blackfly species in the region of Novi Sad. The 3rd EMCA Workshop. Osijek, Croatia, October 6th-9th, 2004. *Abstract Book*, 22-23.

- Zhang, Y., Malmqvist, B. & Englund, G. (1998). Ecological processes affecting community structure of blackfly larvae in regulated and unregulated rivers: a regional study. *Journal of Applied Ecology*, 35(5), 673-686.
- Zídková, L., Cepicka, I., Szabová, J. & Svobodová, M. (2012). Biodiversity of avian trypanosomes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(1), 102-112.
- Živković, V. (1970). Simulide (Diptera, Simuliidae) koje napadaju čoveka i domaće životinje. *Acta Veterinaria, Belgrade*. 20, 209-219.
- Živković, V. & Burany, B. (1972). An outbreak of *Boophthora erythrocephala* (Diptera, Simuliidae) in Yugoslavia in 1970. *Acta Veterinaria, Belgrade*. 22(3), 133-142.
- Živković, V. (1958). O masovnoj pojavi *Simulium maculatum* u južnom Banatu. *Acta veterinaria*, 8(4), 7-14.
- Živković, V. (1961). Rasprostranjenost i značaj simulida (Diptera, Simuliidae) u Jugoslaviji. *Glas Srpske akademije nauka i umetnosti, Odeljenje medicinskih nauka*, 248(16), 133-142.
- Živković, V. (1967a). Simulide (Diptera, Simuliidae) Dunava na području Vojvodine. *Acta veterinaria, Beograd*, 17(4), 433-438.
- Živković, V. (1967b). Invazija *Simulium erythrocephalum* De Geer 1776 (Diptera, Simuliidae) u Vojvodini. *Glas Srpske akademije nauka. Odeljenje medicinskih nauka*, 274(20), 163-170.
- Živković, V. (1969). Simulide (Diptera, Simuliidae) Vojvodine. II deo. *Acta veterinaria, Beograd*, 19(5), 297-306.
- Živković, V. (1970a). Simulide (Diptera, Simuliidae) koje napadaju čoveka i domaće životinje. *Acta veterinaria, Beograd*, 20, 209-219.
- Živković, V. (1971): Black flies (Diptera, Simuliidae) of the Danube in Yugoslavia. *Acta Veterinaria, Belgrade*, 21(5), 225-236.
- Živković, V. (1975). u originalu Živkovitch, V. (1975). Present state of black flies (Diptera, Simuliidae) in the Djerdap Gorge (Iron Gate) of the Danube in Yugoslavia. *Acta veterinaria, Beograd*. 25(6), 279-285.

PRILOZI

PRILOZI

Prilog 1. Spisak istraživanih lokaliteta i tipologija - geografska širina i dužina, nadmorska visina, kategorija nadmorske visine, tip vodotoka, hidroekoregion (Illies,1978; Paunović i sar., 2012) i sliv kome lokaliteti pripadaju.

br lok.	Država	Reka	Datum uzorkovanja	N lat	E long	NV (m)	Kat. NV	Tip vod.	ER	Sliv kod
1	SRB	Bresnička reka	06.10.2014.	42.43427	22.50756	709	2	4	7	3
2	SRB	Dobrodolska reka	07.10.2014.	42.50875	22.47507	775	2	4	7	3
3	SRB	Izvorištica	07.10.2014.	42.50409	22.49215	777	2	4	7	3
4	SRB	Dragovištica	07.10.2014.	42.46039	22.49018	721	2	3	7	3
5	SRB	Golema reka	08.10.2014.	42.47571	22.37950	923	3	4	7	3
6	SRB	Dejanova reka	09.10.2014.	42.63363	22.3853	1138	3	4	7	3
7	SRB	Lisinska reka	09.10.2014.	42.57245	22.35326	1019	3	4	7	3
8	SRB	Toplodolska reka	09.10.2014.	42.59905	22.40248	1069	3	4	7	3
9	SRB	Jerma	09.10.2014.	42.75947	22.4127	881	3	4	5	1
10	SRB	Blederija izvor	25.04.2015.	44.51751	22.35986	206	1	4	10	1
11	SRB	Blederija 2	25.04.2015.	44.50968	22.37014	162	1	3	10	1
12	SRB	Blederija 3	25.04.2015.	44.48982	22.43947	75	1	3	10	1
13	SRB	Urovica 1	25.04.2015.	44.40703	22.40124	88	1	3	10	1
14	SRB	Vratna 2	26.04.2015.	44.38316	22.33621	224	1	3	10	1
15	SRB	Zamna 1	26.04.2015.	44.29210	22.27619	189	1	3	10	1
16	SRB	Zamna 2	26.04.2015.	44.29788	22.35497	189	1	3	10	1
17	SRB	Porečka reka	26.04.2015.	44.35900	22.17969	106	1	3	10	1
18	SRB	Rasina 1	13.10.2015.	43.49035	20.90647	721	2	3	5	1
19	SRB	Rasina 2	18.08.2015.	43.50556	20.85694	721	2	3	5	1
20	SRB	Lomnička reka	14.10.2015.	43.47132	21.35532	273	1	3	5	1
21	SRB	Jošanička reka	16.10.2015.	44.2317	21.69268	266	1	3	5	1
22	SRB	Breznička reka	16.10.2015.	44.26447	21.56777	266	1	3	5	1
23	SRB	Tripušnica	22.10.2015.	42.40442	22.17308	877	3	4	7	3
24	SRB	Pčinja 1	20.10.2015.	42.38440	22.04884	583	2	3	7	3
25	SRB	Pčinja 2	21.10.2015.	42.38356	22.00983	548	2	3	7	3
26	SRB	Pčinja 3	21.10.2015.	42.37734	21.96790	529	2	3	7	3
27	SRB	Bistrica	09.08.2016.	43.47292	19.63678	677	2	4	5	1
28	SRB	Lim	09.08.2016.	43.39328	19.64515	456	1	2	5	1
29	SRB	Zložnica	09.08.2016.	43.47688	19.83223	912	3	4	5	1
30	SRB	Sušica	09.08.2016.	43.78745	19.73547	657	2	4	5	1
31	SRB	Karačica	10.08.2016.	43.84101	19.60552	738	2	4	5	1
32	SRB	Đetinja 1	10.08.2016.	43.85448	19.62327	682	2	3	5	1
33	SRB	Đetinja 2	13.04.2018.	43.85850	19.66122	639	2	3	5	1
34	SRB	Čemernica	10.08.2016.	43.90929	20.40333	235	1	3	5	1
35	SRB	Despotovica	10.08.2016.	43.97496	20.41918	263	1	3	5	1
36	SRB	Radošnica	11.06.2017.	43.27510	20.64318	406	1	4	5	1
37	SRB	Ibar 1	11.06.2017.	43.28802	20.61581	401	1	2	5	1
38	SRB	Ibar 2	19.06.2013.	43.63067	20.54314	261	1	2	5	1
39	SRB	Jošanica	11.06.2017.	43.40170	20.67774	405	1	3	5	1
40	SRB	Studonica	11.06.2017.	43.48981	20.53196	444	1	3	5	1

PRILOZI

Nastavak **Priloga 1.**

br lok.	Država	Reka	Datum uzorkovanja	N lat	E long	NV (m)	Kat. NV	Tip vod.	ER	Sliv kod
41	SRB	Mileševka	10.04.2019.	43.36934	19.70133	590	2	3	5	1
42	SRB	Trudovačka reka	11.04.2019.	43.47806	19.95677	1147	3	4	5	1
43	SRB	Moravica	11.04.2019.	43.60756	20.20757	462	1	3	5	1
44	SRB	Sokobanjska Moravica	05.11.2010.	43.63500	21.89389	382	1	3	5	1
45	SRB	Kamenica	21.05.2019.	44.27940	20.69551	154	1	3	5	1
46	SRB	Tamnava	21.05.2019.	44.57112	20.21151	79	1	3	11	1
47	SRB	Vapa	25.05.2019.	43.29043	20.05290	1016	3	4	5	1
48	SRB	Katušnica	26.05.2019.	43.66909	19.84347	914	3	4	5	1
49	SRB	Veliki Rzav	26.05.2019.	43.74057	20.04122	431	1	2	5	1
50	SRB	Grza 1	12.06.2019.	43.86347	21.47871	158	1	3	5	1
51	SRB	Grza 2	04.09.2016.	43.89875	21.65000	418	1	4	5	1
52	SRB	Crnica	12.06.2019.	43.85555	21.36164	121	1	3	5	1
53	SRB	Ravanica 1	12.06.2019.	43.95006	21.43711	159	1	3	5	1
54	SRB	Ravanica 2	12.06.2019.	43.93984	21.41635	137	1	3	5	1
55	SRB	Čadavica	15.06.2019.	44.37317	19.34702	326	1	3	11	1
56	SRB	Štira 1	15.06.2019.	44.50064	19.33947	160	1	3	11	1
57	SRB	Štira 2	15.06.2019.	44.45949	19.24128	372	1	3	5	1
58	SRB	Krupinska reka	16.06.2019.	44.27296	19.31132	162	1	3	5	1
59	SRB	Nišava 1	23.07.2019.	43.01742	22.71021	516	2	2	5	1
60	SRB	Nišava 2		43.01064	22.80336	458	1	2	5	1
61	SRB	Dojkinačka reka	28.07.2019.	43.25794	22.76789	1159	3	3	5	1
62	SRB	Pek 1	12.08.2019.	44.54372	21.60952	182	1	2	5	1
63	SRB	Pek 2	20.08.2015.	44.48125	21.77975	189	1	2	5	1
64	SRB	Pek 3	20.08.2015.	44.49018	21.63208	142	1	2	5	1
65	SRB	Samokovska reka	13.10.2019.	43.33239	20.75602	1437	3	4	5	1
66	SRB	Planska reka	13.10.2019.	43.39629	20.73817	533	2	4	5	1
67	SRB	Peštan	20.05.2019.	44.42227	20.26507	95	1	3	11	1
68	SRB	Beljanica	2.10.2019.	44.5021	20.29965	109	1	3	11	1
69	SRB	Barajevska reka	20.05.2019.	44.55595	20.39990	116	1	3	11	1
70	SRB	Ralja	20.05.2019.	44.58921	20.82837	108	1	3	5	1
71	SRB	Marica	20.05.2019.	44.58586	20.24245	88	1	3	11	1
72	SRB	Kolubara	20.05.2019.	44.36703	20.19469	102	1	2	11	1
73	SRB	Sava	23.05.2019.	44.77187	20.35929	70	1	1	11	1
74	SRB	Dunav	13.05.2021.	44.75523	20.65396	68	1	1	11	1
75	SRB	Velika Morava 1	04.07.2019.	43.71887	21.38133	133	1	2	5	1
76	SRB	Velika Morava 2	18.05.2017.	44.58587	21.13104	72	1	1	11	1
77	SRB	Barička reka	22.05.2021.	44.64200	20.26120	131	1	1	11	1
78	SRB	Džamov potok	15.09.2015.	43.96833	22.13528	199	1	4	7	1
79	SRB	Grčeva reka	14.09.2015.	44.04028	22.156389	244	1	3	7	1
80	SRB	Barska reka	28.04.2021.	43.06023	20.66227	1078	3	4	5	1
81	SRB	Karavansalajska reka 1	28.04.2021.	43.05341	20.64602	1150	3	4	5	1

PRILOZI

Nastavak **Priloga 1.**

br lok.	Država	Reka	Datum uzorkovanja	N lat	E long	NV (m)	Kat. NV	Tip vod.	ER	Sliv kod
82	SRB	Karavansalajska reka 2	28.04.2021.	43.04552	20.66000	1072	3	4	5	1
83	SRB	Kašaljska reka	29.04.2021.	43.04414	20.63992	1106	3	4	5	1
84	SRB	Premećska reka	13.04.2015.	43.76829	20.41166	480	1	4	5	1
85	SRB	Zapadna Morava	23.04.2015.	43.89572	20.31382	240	1	2	5	1
86	SRB	Jelašnica	24.09.2017.	43.27638	22.06826	327	1	3	5	1
87	SRB	Lisinski vodopadi	28.07.2018.	44.10249	21.64023	403	1	4	5	1
88	SRB	Resava 2	29.07.2018.	44.09789	21.55349	284	1	3	5	1
89	SRB	Resava 3	29.07.2018.	44.08903	21.53906	260	1	3	5	1
90	SRB	Gornji Radalj 1	30.07.2011.	44.38602	19.26248	709	2	4	5	1
91	SRB	Gornji Radalj 2	28.07.2011.	44.39093	19.25395	656	2	4	5	1
92	SRB	Gornji Radalj 3	28.07.2011.	44.39245	19.24680	533	2	4	5	1
93	SRB	Gornji Radalj 4	28.07.2011.	44.39423	19.24017	483	1	4	5	1
94	SRB	Crni Radalj 1	30.07.2011.	44.40165	19.17392	175	1	3	5	1
95	SRB	Crni Radalj 2	30.07.2011.	44.41335	19.14818	140	1	3	5	1
96	SRB	Gračanica	04.07.2015.	44.23400	19.34851	168	1	3	5	1
97	SRB	Boranja	04.07.2015.	44.33785	19.16417	243	1	4	5	1
98	SRB	potok Sko Grad	04.07.2015.	44.26893	19.42931	462	1	4	5	1
99	SRB	Pocibrava 1	10.05.2015.	44.24961	19.92861	185	1	3	11	1
100	SRB	Pocibrava 2	10.05.2015.	44.24946	19.93205	178	1	3	11	1
101	SRB	Valja Streži	18.04.2013.	44.18653	21.88511	524	2	4	5	1
102	SRB	Valja Sake	21.06.2013.	44.23674	21.87542	683	2	4	5	1
103	SRB	Jablanica 1	28.04.2013.	44.21129	19.71359	397	1	3	11	1
104	SRB	Jablanica 2	22.04.2013.	44.25549	19.77703	272	1	3	11	1
105	SRB	Belosavac	13.05.2015.	44.19831	21.75298	304	1	3	5	1
106	SRB	Graševačka reka	15.05.2015.	43.35063	20.98714	528	2	4	5	1
107	SRB	Malava 1	16.10.2015.	44.27153	21.53673	181	1	3	5	1
108	SRB	Mlava 2	16.10.2015.	44.39468	21.40150	118	1	3	5	1
109	SRB	Pusta reka	31.10.2010.	43.19296	21.84140	195	1	3	5	1
110	SRB	Južna Morava	21.03.2011.	43.21148	21.84272	194	1	2	5	1
111	SRB	Poganovski potok	21.06.2021.	42.98101	22.63894	508	2	4	5	1
112	SRB	Uvac 1	21.04.2018.	43.54051	19.71097	741	2	3	5	1
113	SRB	Uvac 2	20.04.2018.	43.30394	19.99410	995	3	3	5	1
114	SRB	Crni Rzav 1	21.04.2018.	43.63936	19.71342	1034	3	3	5	1
115	SRB	Crni Rzav 2	09.10.2011.	43.66329	19.70867	1008	3	3	5	1
116	SRB	Tripušnica	05.04.2018.	42.41413	22.27600	1124	3	3	7	3
117	SRB	Kočurica 1	06.04.2018.	42.40707	22.03730	614	2	3	7	3
118	SRB	Kočurica 2	07.04.2018.	42.41079	22.03905	627	2	3	7	3
119	SRB	Golema reka	08.04.2018.	42.49756	22.12683	670	2	3	5	1
120	SRB	Lesnička Reka	14.04.2019.	42.35027	22.12479	727	2	3	7	3
121	SLO	Sava 1	01.09.2014.	46.29743	14.03679	493	1	3	4	1
122	SLO	Sava 2	01.09.2014.	46.34076	14.26059	495	1	2	4	1
123	SLO	Sava 3	01.09.2015.	46.34077	14.16525	415	1	2	4	1

PRILOZI

Nastavak Priloga 1.

br lok.	Država	Reka	Datum uzorkovanja	N lat	E long	NV (m)	Kat. NV	Tip vod.	ER	Sliv kod
124	SLO	Sava 4	01.09.2015.	46.46293	13.94389	645	2	3	4	1
125	SLO	Sava 5	01.09.2014.	46.11985	14.99282	216	1	2	5	1
126	SLO	Sava 6	01.09.2015.	46.08788	14.89495	229	1	2	5	1
127	SLO	Sava 7	01.09.2015.	45.88408	15.64083	138	1	2	5	1
128	SLO	Blejski Vintgar	21.04.2017.	46.39087	14.08427	578	2	3	4	1
129	HR	Sava 8	04.09.2014.	45.75964	16.04785	105	1	2	5	1
130	BIH	Bukovica	02.10.2017.	44.87244	17.22548	146	1	3	5	1
131	BIH	Dragočajka	02.10.2017.	44.85418	17.15948	162	1	3	5	1
132	BIH	Lubovačka rijka	03.10.2017.	44.28834	17.08267	452	1	3	5	1
133	BIH	Kupreška reka	03.10.2017.	44.09771	17.22240	905	3	4	5	1
134	BIH	Janj 1	03.10.2017.	44.23855	17.10185	461	1	4	5	1
135	BIH	Janj 2	03.10.2017.	44.26787	17.09999	446	1	4	5	1
136	BIH	Janj 3	25.08.2018.	44.21859	17.12230	555	2	4	5	1
137	BIH	Pliva	03.10.2017.	44.32011	17.15433	430	1	3	5	1
138	BIH	Sana 1	04.10.2017.	44.97360	16.70409	130	1	3	5	1
139	BIH	Sana 2	04.10.2017.	45.04914	16.38383	118	1	2	5	1
140	BIH	Una 1	04.10.2017.	45.05103	16.37922	120	1	2	5	1
141	BIH	Una 2	04.10.2017.	45.18456	16.80903	98	1	2	5	1
142	BIH	Krupa	05.10.2017.	44.61598	17.14906	203	1	3	5	1
143	BIH	Vrbanja	05.10.2017.	44.73851	17.28186	175	1	3	5	1
144	BIH	Vrbas 1	05.10.2017.	44.62472	17.15298	208	1	2	5	1
145	BIH	Vrbas 2	05.10.2017.	44.69740	17.19744	175	1	2	5	1
146	BIH	Vrbas 3	05.10.2017.	45.05085	17.45243	93	1	2	5	1
147	BIH	Povelić	05.10.2017.	45.07683	17.49104	94	1	3	5	1
148	BIH	Bosna	05.10.2017.	44.96960	18.28762	97	1	2	5	1
149	BIH	Hrčavka	26.06.2015.	43.36296	18.67126	616	2	4	5	1
150	BIH	Sutjeska	27.06.2015.	43.29898	18.64579	806	3	3	5	1
151	BIH	Klobučarica	27.06.2015.	43.26997	18.61551	833	3	4	5	1
152	BIH	Jabušnica	27.06.2015.	43.29269	18.61461	780	2	4	5	1
153	BIH	Izgorka	29.06.2015.	43.26491	18.62217	830	3	4	5	1
154	BIH	Trtošnica	29.06.2015.	43.26358	18.61821	867	3	4	5	1
155	BIH	Perućica	29.06.2015.	43.33203	18.69497	709	2	4	5	1
156	BIH	Trešanica	30.07.2016.	43.66544	17.97490	300	1	3	5	2
157	BIH	Neretva	31.07.2016.	43.14923	17.73739	10	1	2	5	2
158	BIH	Ugar 1	30.04.2018.	44.36953	17.48752	674	2	3	5	1
159	BIH	Ugar 2	30.04.2018.	44.36441	17.49008	687	2	3	5	1
160	CG	Pčinja	08.08.2016.	42.79996	19.46980	986	3	3	5	1
161	CG	Tara 1	08.08.2016.	42.87258	19.52773	894	3	2	5	1
162	CG	Tara 2	03.07.2018.	42.86181	19.52581	945	3	2	5	1
163	CG	Tara 3	10.08.2017.	42.80072	19.16382	1440	3	2	5	1
164	CG	Tara 4	10.08.2017.	43.17943	19.24038	600	2	2	5	1
165	CG	Tara 5	10.08.2017.	43.21535	19.10813	567	2	2	5	1

PRILOZI

Nastavak Priloga 1.

br lok.	Država	Reka	Datum uzorkovanja	N lat	E long	NV (m)	Kat. NV	Tip vod.	ER	Sliv kod
166	CG	Tara 6	11.08.2017.	43.25707	18.99428	538	2	2	5	1
167	CG	Tara 7	11.08.2017.	43.36057	18.91221	465	1	2	5	1
168	CG	Morača 1	08.08.2016.	42.47725	19.30479	43	1	2	5	2
169	CG	Morača 2	22.03.2017.	42.76008	19.39045	244	1	2	5	2
170	CG	Morača 3	06.07.2018.	42.43194	19.22448	21	1	2	5	2
171	CG	Komarnica	22.03.2017.	42.98953	19.06871	944	3	3	5	1
172	CG	Grlja vodopad	05.05.2017.	42.52278	19.84287	989	3	4	6	1
173	CG	Zeta 1	10.05.2017.	42.63190	19.01709	45	1	2	5	2
174	CG	Zeta 2	04.07.2018.	42.79294	18.93425	617	2	2	5	2
175	CG	Zeta 3	04.07.2018.	42.46827	19.25784	32	1	2	5	2
176	CG	Bukovica 1	08.05.2017.	42.96010	19.18400	1070	3	3	5	1
177	CG	Bukovica 2	08.05.2018.	42.95396	19.07557	820	3	3	5	1
178	CG	Bjela	25.03.2017.	42.94978	19.09946	860	3	3	5	1
179	CG	Breznica	03.07.2018.	43.36344	19.29890	764	2	3	5	1
180	CG	Čehotina 1	03.07.2018.	43.39504	19.15016	661	2	3	5	1
181	CG	Čehotina 2	03.07.2018.	43.31162	19.38553	835	3	3	5	1
182	CG	Lim 1	02.07.2018.	42.75027	19.79350	734	2	2	5	1
183	CG	Lim 2	02.07.2018.	43.13495	19.77559	534	2	2	5	1
184	CG	Rijeka Crnojevića	04.07.2018.	42.35670	19.01242	10	1	2	5	2
185	CG	Bojana	05.07.2018.	41.96885	19.38446	8	1	2	5	2
186	CG	Cjevna	25.03.2017.	42.38299	19.27888	37	1	3	5	2
187	AL	Kir river	23.11.2016.	42.09415	19.54151	24	1	2	6	2
188	AL	Buna River	23.11.2016.	42.04455	19.48473	6	1	2	5	2
189	AL	Black Drini 1	24.11.2016.	41.57905	20.43555	429	1	2	6	2
190	AL	Black Drini 2	24.11.2016.	41.93505	20.36257	298	1	2	6	2
191	AL	Seman	26.11.2016.	40.75017	19.57935	7	1	2	6	2
192	AL	Gnjanica	13.02.2017.	40.64706	19.62229	60	1	2	6	2
193	AL	Vajgurare	15.02.2017.	40.75615	19.88986	29	1	2	6	2
194	AL	Drini Lezhe 1	02.2017.	41.76558	19.63309	1	1	2	6	2
195	AL	Drini Lezhe 2	15.02.2017.	41.96941	19.55052	11	1	3	6	2
196	AL	Devolli 1	15.02.2017.	40.74622	20.33437	381	1	2	6	2
197	AL	Devolli 2	15.02.2017.	40.71198	20.77728	815	3	3	6	2
198	AL	Devolli 3	16.02.2017.	40.69999	20.89213	833	3	2	6	2
199	AL	Devolli 4	16.02.2017.	40.69176	20.93568	840	3	3	6	2
200	AL	Dumer korge	15.02.2017.	40.65671	20.74629	827	3	3	6	2
201	MAK	Leva reka	21.06.2017.	41.14269	21.00044	943	3	3	6	2
202	MAK	Sateska Reka	22.06.2017.	41.17086	20.72718	692	2	3	6	2
203	MAK	Radika	22.06.2017.	41.53534	20.58502	595	2	3	6	2
204	MAK	Šemnica Prilepska	23.06.2017.	41.11325	21.36254	585	2	3	6	3
205	MAK	akumulacija	23.06.2017.	41.39214	21.60482	747	2	3	6	3
206	MAK	Vardar 1	23.06.2017.	41.50837	22.10412	115	1	2	6	3
207	MAK	Vardar 2	23.06.2017.	41.50986	22.10354	116	1	2	6	3

PRILOZI

Nastavak Priloga 1.

br lok.	Država	Reka	Datum uzorkovanja	N lat	E long	NV (m)	Kat. NV	Tip vod.	ER	Sliv kod
208	MAK	Kolešinski vodopadi	24.06.2017.	41.37055	22.80850	411	1	4	7	3
209	MAK	Bregalnica 1	24.06.2017.	41.73248	22.17506	260	1	2	7	3
210	MAK	Bregalnica 2	04.07.2017.	41.71308	22.15434	257	1	2	7	3
211	MAK	Strumica	24.06.2017.	41.49923	22.94353	216	1	3	7	3
212	MAK	Pčinja	04.07.2017.	42.08098	21.77647	280	1	3	7	3
213	BUG	Blato 1	16.09.2017.	42.82353	23.21130	531	2	3	7	1
214	BUG	Blato 2	27.05.2016.	42.87380	23.08290	547	2	3	7	1
215	BUG	Iskar	16.09.2017.	42.82944	23.35992	511	2	3	7	1
216	BUG	Rila	17.09.2017.	42.13187	23.15665	568	2	4	7	3
217	BUG	Struma	17.09.2017.	41.94463	23.09695	310	1	2	7	3
218	BUG	Vurbitsa 1	23.09.2017.	41.33572	25.36916	323	1	3	7	3
219	BUG	Vurbitsa 2	23.09.2017.	41.56963	25.39102	235	1	3	7	3
220	BUG	Perperek	23.09.2017.	41.73641	25.42033	307	1	3	7	3
221	BUG	Kharmanliiska	23.09.2017.	41.92207	25.78525	130	1	3	7	3
222	BUG	Maritsa 1	23.09.2017.	41.92420	25.93498	68	1	2	7	3
223	BUG	Maritsa 2	24.09.2017.	42.21716	24.01055	322	1	2	7	3
224	BUG	Banska reka	23.09.2017.	41.99001	25.50015	133	1	3	7	3
225	BUG	Chepelare	24.09.2017.	41.99436	24.87478	254	1	3	7	3
226	BUG	Archar	27.05.2016.	43.72568	22.72843	172	1	3	7	1
227	GR	Struma	17.09.2017.	41.28250	23.33212	52	1	3	7	3
228	GR	Richios	18.09.2017.	40.67551	23.68805	2	1	3	7	3
229	GR	Chlomo	18.09.2017.	40.58781	23.48589	107	1	3	7	3
230	GR	Havrias	18.09.2017.	40.36984	23.63694	106	1	3	7	3
231	GR	Mavroneri	20.09.2017.	40.23372	22.51449	17	1	3	6	3
232	GR	Enipeas	20.09.2017.	40.08372	22.40693	1098	3	4	6	3
233	GR	Pineios	21.09.2017.	39.72979	21.56455	258	1	3	6	3
234	GR	Venetikos	21.09.2017.	40.05010	21.47878	473	1	4	6	3
235	GR	Aliakmonas	21.09.2017.	40.20685	21.53197	505	2	4	6	3
236	GR	Hudropotamus	22.09.2017.	41.05874	24.09667	52	1	3	7	3
237	GR	Zygaktes	22.09.2017.	41.03831	24.26927	61	1	3	7	3
238	GR	Nestos	22.09.2017.	41.08410	24.77243	40	1	3	7	3
239	GR	Lissos	23.09.2017.	41.05381	25.61724	30	1	3	7	3
240	GR	Nedontas	15.04.2014.	37.02775	22.10249	4	1	3	6	4
241	GR	Glafkos	12.04.2014.	38.20709	21.75924	74	1	3	6	4
242	GR	Peiros 1	13.04.2014.	38.12799	21.62435	22	1	3	6	4
243	GR	Peiros 2	06.04.2015.	38.12799	21.62435	22	1	3	6	4
244	GR	Veliniatika	16.04.2013.	37.90863	22.8213	47	1	3	6	4
245	GR	Eurotas	05.04.2013.	36.84860	22.68023	12	1	2	6	4
246	GR	Erateini	01.04.2014.	38.37312	22.20413	44	1	3	6	4
247	GR	Varnavas	26.04.2014.	38.20803	23.90215	304	1	3	6	3
248	GR	Sperchios Potamos	03.05.2014.	38.92939	22.06064	183	1	3	6	3
249	GR	Pineios	08.09.2015.	39.75143	21.59209	289	1	3	6	3

PRILOZI

Nastavak **Priloga 1.**

br lok.	Država	Reka	Datum uzorkovanja	N lat	E long	NV (m)	Kat. NV	Tip vod.	ER	Sliv kod
250	GR	Gallikos	11.04.2017.	40.82464	22.89679	82	1	3	7	3
251	GR	Marmaras	03.04.2017.	40.08590	23.86683	240	1	3	7	3
252	GR	Agkistros	08.07.2017.	40.45679	25.66725	161	1	3	7	3
253	GR	Katsambos	09.07.2017.	40.48073	25.51876	111	1	3	7	3
254	GR	Fonias izvor	28.07.2017.	40.45382	25.62047	794	2	4	7	3
255	GR	Fonias vodopadi	08.07.2017.	40.47800	25.64516	163	1	3	7	3
256	GR	Fonias	13.07.2016.	40.48993	25.65219	25	1	3	7	3

Prilog 2. Pregled analiziranih jedinki (sekvenci) primeraka *Wilhelmia* COI markerom, preuzetih iz baza gena GenBank i BOLD sistema, njihov pristupni kod, autor (Unp. – neobjavljena u vidu rada, u trenutku korišćenja) i država (LIT – Litvanija, FRA – Francuska, TUR – Turska, NEM – Nemačka, ŠPA - Španija, UKR – Ukrajna, ENG – Engleska, JER – Jermenija, PAK – Pakistan, FIN – Finska).

pristupni brojevi	Autor	Drž.	iz baze gena	pristupni brojevi	Autor	Drž.	iz baze gena
GU203457	Bernotiene, Unp.	LIT	GenBank	SPSIM054	Unp.	ŠPA	BOLD
KP861118	Day i Post, Unp.	FRA	GenBank	SPSIM056	Unp.	ŠPA	BOLD
JX441380	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	SPSIM057	Unp.	ŠPA	BOLD
KF155173	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	SPSIM073	Unp.	ŠPA	BOLD
KF990255	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	SPSIM074	Unp.	ŠPA	BOLD
KF155174	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	SPSIM075	Unp.	ŠPA	BOLD
JQ030883	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	SPSIM076	Unp.	ŠPA	BOLD
KF990256	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	SPSIM077	Unp.	ŠPA	BOLD
JQ034312	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	SPSIM078	Unp.	ŠPA	BOLD
JX441377	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	SPSIM079	Unp.	ŠPA	BOLD
JX441376	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	GU203466	Bernotiene, Unp.	LIT	GenBank
KF990258	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	GU203470	Bernotiene, Unp.	LIT	GenBank
KF155170	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	GU203471	Bernotiene, Unp.	LIT	GenBank
KF990249	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	GU203473	Bernotiene, Unp.	UKR	GenBank
KF990261	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	GU203467	Bernotiene, Unp.	LIT	GenBank
JX444910	Inci i sar., 2017	NEM	GenBank	KF990264	Inci i sar., 2017	NEM	GenBank
KF990263	Inci et. al, 2017	NEM	GenBank	GU203472	Bernotiene, Unp.	TUR	GenBank
JQ034308	Inci et. al, 2017	TUR	GenBank	GU203468	Bernotiene, Unp.	TUR	GenBank
KF990251	Inci et. al, 2017	TUR	GenBank	KP861103	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
KF155171	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861115	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
JQ034309	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KX759636	Inci i sar., 2017	NEM	GenBank
KF990253	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	GU203474	Bernotiene, Unp.	LIT	GenBank
KF155175	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861092	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
KF155177	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861093	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
SPSIM048	Unp.	ŠPA	BOLD	KP861100	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
MGMI1317	Unp.	NEM	BOLD	KP861105	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
GU203456	Bernotiene, Unp.	LIT	GenBank	KP861111	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
JX441381	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861102	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
KX759640	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861110	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
JQ034311	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861106	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
KF155172	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	GU203469	Bernotiene, Unp.	LIT	GenBank
KF990254	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861091	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
JQ034313	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861095	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank

PRILOZI

Nastavak Priloga 2.

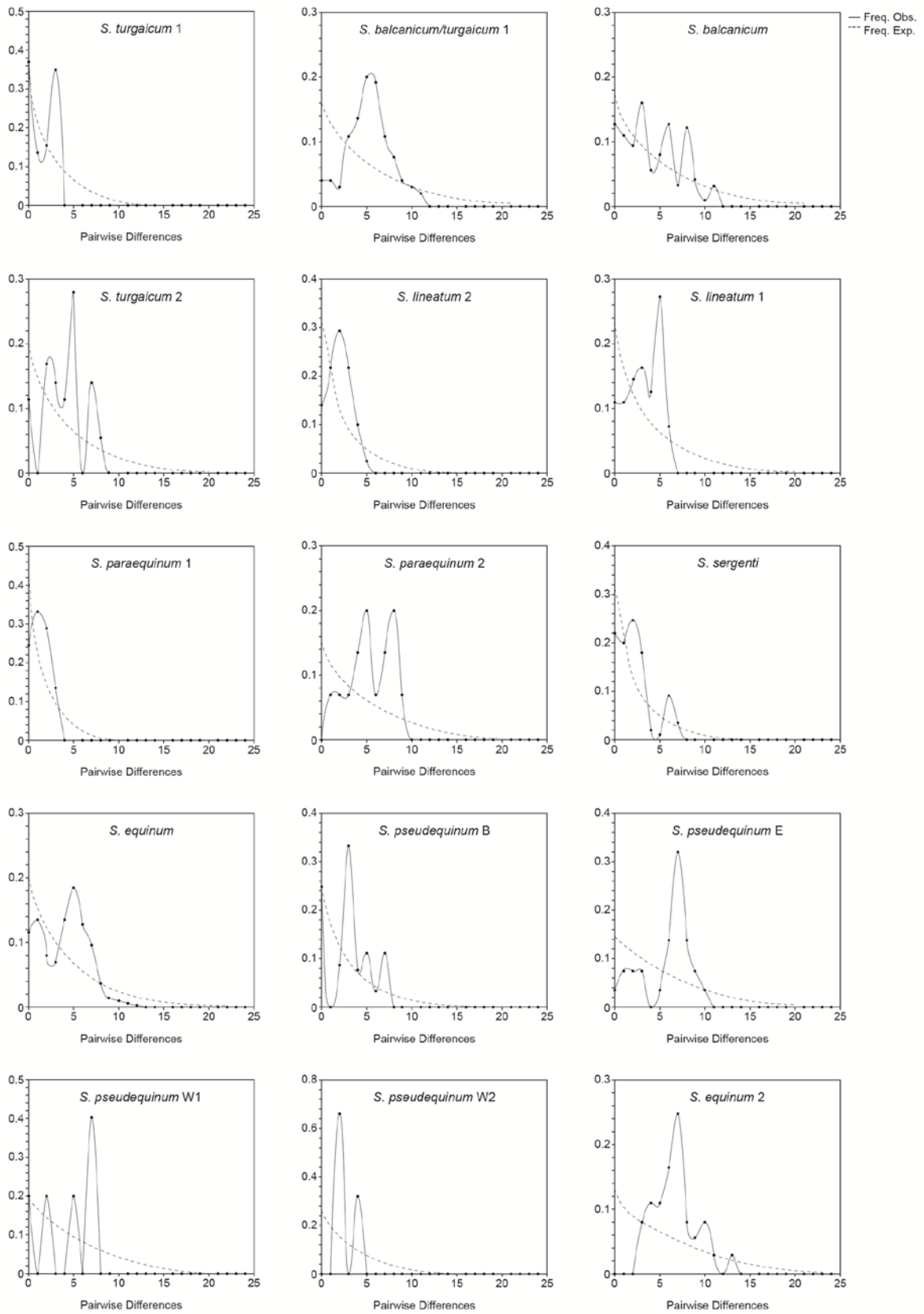
pristupni brojevi	Autor	Drž.	iz baze gena	pristupni brojevi	Autor	Drž.	iz baze gena
KF155168	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861097	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
KF990250	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861113	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
GU203465	Bernotiene, Unp.	LIT	GenBank	KP861094	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
KX759639	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861104	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
JQ034310	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861101	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
KF155169	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861112	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
KF990252	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861096	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
KF990260	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861098	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
JX441379	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861099	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
KF155176	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861108	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
KF990257	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	KP861107	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
KF640031	Andrianov i sar., 2015	JER	GenBank	KP861109	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank
KF990259	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	BFUKP049	Unp.	ENG	BOLD
KX759638	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	BFUKP050	Unp.	ENG	BOLD
KX759641	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank	BFUKP051	Unp.	ENG	BOLD
GU203464	Bernotiene, Unp.	LIT	GenBank	BFUKP053	Unp.	ENG	BOLD
GU203463	Bernotiene, Unp.	LIT	GenBank	BFUKP054	Unp.	ENG	BOLD
GU203460	Bernotiene, Unp.	LIT	GenBank	BFUKP055	Unp.	ENG	BOLD
GU203459	Bernotiene, Unp.	LIT	GenBank	BFUKP056	Unp.	ENG	BOLD
GU203462	Bernotiene, Unp.	UKR	GenBank	BFUKP060	Unp.	ENG	BOLD
KP861116	Day and Post, Unp.	UKR	GenBank	SPSIM027	Unp.	ŠPA	BOLD
GU203461	Bernotiene, Unp.	UKR	GenBank	SPSIM044	Unp.	ŠPA	BOLD
KP861117	Day and Post, Unp.	ENG	GenBank	SPSIM045	Unp.	ŠPA	BOLD
KX759637	Inci i sar., 2017	NEM	GenBank	SPSIM087	Unp.	ŠPA	BOLD
SPSIM026	Unp.	ŠPA	BOLD	SPSIM088	Unp.	ŠPA	BOLD
SPSIM037	Unp.	ŠPA	BOLD	KF640041	Andrianov, 2015	JER	GenBank
SPSIM039	Unp.	ŠPA	BOLD	KF640042	Andrianov, 2015	JER	GenBank
SPSIM040	Unp.	ŠPA	BOLD	KX759635	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank
SPSIM049	Unp.	ŠPA	BOLD	KX759633	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank
SPSIM025	Unp.	ŠPA	BOLD	KX759634	Inci i sar., 2017	TUR	GenBank
GMGMI548	Unp.	NEM	BOLD I	KF640044	Andrianov, 2015	JER	GenBank
GMGMC1223	Unp.	NEM	BOLD	KF640047	Andrianov, 2015	JER	GenBank
GMGMI1476	Unp.	NEM	BOLD	KY831974	Ashfaq et. al, Unp.	PAK	GenBank
GMGMI1224	Unp.	NEM	BOLD	KP861119	Day i Post, Unp.	ENG	GenBank
GMGMI1564	Unp.	NEM	BOLD I	KP861120	Day i Post, Unp.	ENG	GenBank
KF640060	Andrianov i sar., 2015	JER	GenBank	KP861123	Day i Post, Unp.	ENG	GenBank
KF640061	Andrianov i sar., 2015	JER	GenBank	KP861121	Day i Post, Unp.	ENG	GenBank
KF640063	Andrianov i sar., 2015	JER	GenBank	KP861122	Day i Post, Unp.	ENG	GenBank
KF640064	Andrianov i sar., 2015	JER	GenBank	KP861124	Day i Post, Unp.	ENG	GenBank
KF640062	Andrianov i sar., 2015	JER	GenBank	MF458826	Corse i sar., 2017	FRA	GenBank
KF640065	Andrianov i sar., 2015	JER	GenBank	MF458827	Corse i sar., 2017	FRA	GenBank
KX673584	Inci i sar. 2017	TUR	GenBank	SPSIM046	Unp.	ŠPA	BOLD
KX673587	Inci i sar. 2017	TUR	GenBank	KX673578	Onder i sar. Unp.	TUR	GenBank
KX673585	Inci i sar. 2017	TUR	GenBank	KX673581	Onder i sar. Unp.	TUR	GenBank
KX673589	Onder i sar. Unp.	TUR	GenBank	KX673580	Onder i sar. Unp.	TUR	GenBank
KX673586	Onder i sar. Unp.	TUR	GenBank	KX673579	Onder i sar. Unp.	TUR	GenBank
KX673588	Onder i sar. Unp.	TUR	GenBank	FISIM101	Unp.	FIN	BOLD
SPSIM034	Unp.	ŠPA	BOLD	FISIM102	Unp.	FIN	BOLD)
SPSIM035	Unp.	ŠPA	BOLD	FISIM103	Unp.	FIN	BOLD
SPSIM041	Unp.	ŠPA	BOLD	FISIM104	Unp.	FIN	BOLD
SPSIM051	Unp.	ŠPA	BOLD	FISIM105	Unp.	FIN	BOLD
SPSIM053	Unp.	ŠPA	BOLD				

PRILOZI

Prilog 3. Pregled analiziranih jedinki (sekvenci) primeraka *S. reptans* i *S. reptantoides* COI markerom, preuzetih iz baza gena GenBank i BOLD sistema, njihov pristupni kod, autor (Unp. – neobjavljena u vidu rada, u trenutku korišćenja) i država (LAT – Letonija, LIT – Litvanija, ŠVE – Švedska, SLO – Slovačka, ENG – Engleska).

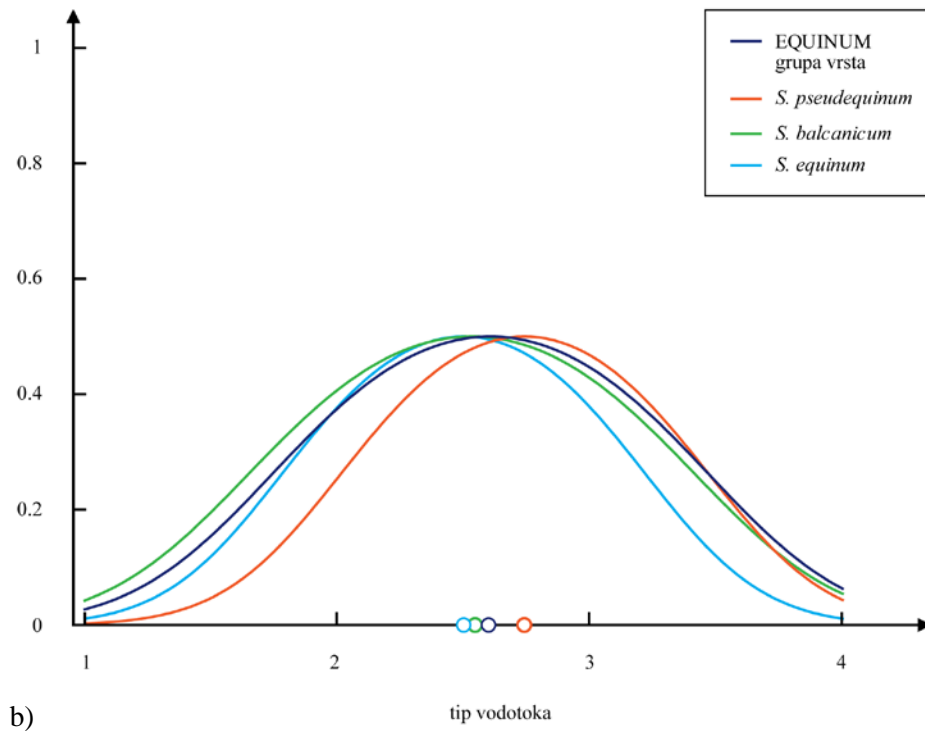
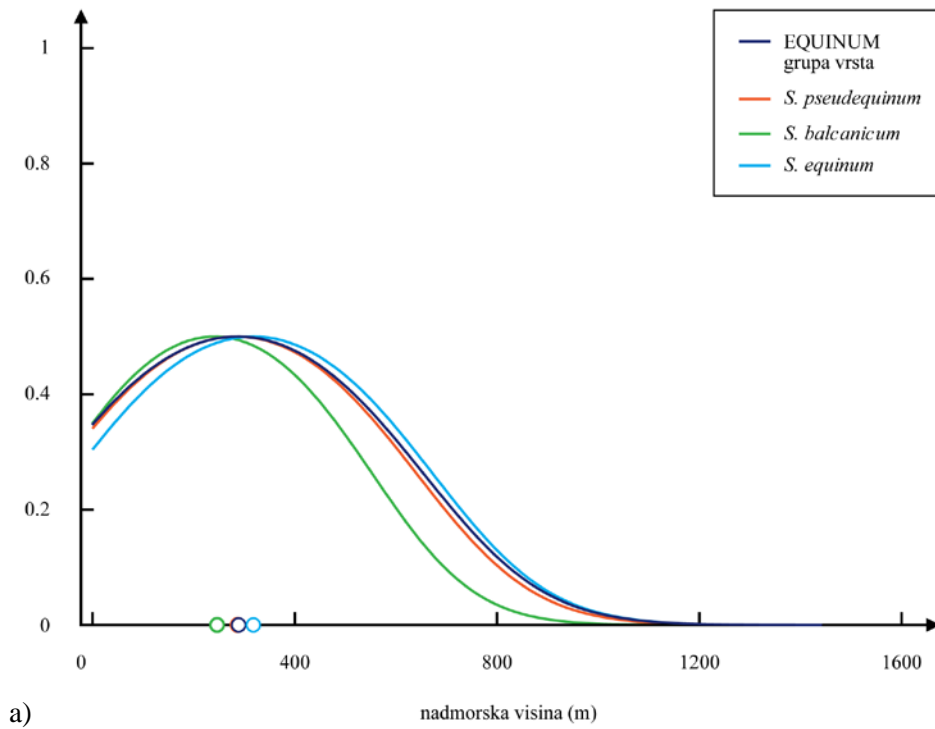
pristupni brojevi	Autor	Drž.	iz baze gena	pristupni brojevi	Autor	Drž.	iz baze gena
KF822596	Kúdela i sar., 2014	LAT	GenBank	KF822622	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
KF822597	Kúdela i sar., 2014	LAT	GenBank	KF822623	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
KF822598	Kúdela i sar., 2014	LIT	GenBank	KF822624	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
KF822599	Kúdela i sar., 2014	LIT	GenBank	KF822625	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
KF822600	Kúdela i sar., 2014	ŠVE	GenBank	KF822626	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
KF822601	Kúdela i sar., 2014	ŠVE	GenBank	KF822627	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
KF822602	Kúdela i sar., 2014	ŠVE	GenBank	KF822628	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
KF822603	Kúdela i sar., 2014	ŠVE	GenBank	KF822629	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
KF822604	Kúdela i sar., 2014	ŠVE	GenBank	KF822630	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
KF822605	Kúdela i sar., 2014	ŠVE	GenBank	EU025948	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
KF822606	Kúdela i sar., 2014	ŠVE	GenBank	EU025950	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
KF822607	Kúdela i sar., 2014	ŠVE	GenBank	EU025954	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
KF822608	Kúdela i sar., 2014	ŠVE	GenBank	EU025955	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
KF822609	Kúdela i sar., 2014	ŠVE	GenBank	EU025956	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
KF822610	Kúdela i sar., 2014	ŠVE	GenBank	EU025957	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
KF822611	Kúdela i sar., 2014	ŠVE	GenBank	EU025958	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
KF822612	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank	EU025959	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
KF822613	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank	EU025960	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
KF822614	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank	EU025961	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
KF822615	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank	EU025962	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
KF822616	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank	EU025963	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
EU025942	Day i sar., 2008	ENG	GenBank	EU025964	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
EU025943	Day i sar., 2008	ENG	GenBank	EU025965	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
EU025944	Day i sar., 2008	ENG	GenBank	EU025966	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
EU025945	Day i sar., 2008	ENG	GenBank	EU025967	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
EU025946	Day i sar., 2008	ENG	GenBank	EU025968	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
EU025947	Day i sar., 2008	ENG	GenBank	EU025969	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
EU025949	Day i sar., 2008	ENG	GenBank	EU025970	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
EU025951	Day i sar., 2008	ENG	GenBank	EU025952	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
GQ121362	Bernotiené i Stunžėnas 2009	LIT	GenBank	EU025953	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
GQ121363	Bernotiené i Stunžėnas 2009	LAT	GenBank	KF822617	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
GQ121364	Bernotiené i Stunžėnas 2009	LIT	GenBank	KF822618	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
GQ121365	Bernotiené i Stunžėnas 2009	LIT	GenBank	KF822619	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
GQ121362	Bernotiené i Stunžėnas 2009	LIT	GenBank	EU025952	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
GQ121363	Bernotiené i Stunžėnas 2009	LAT	GenBank	EU025953	Day i sar., 2008	ENG	GenBank
GQ121364	Bernotiené i Stunžėnas 2009	LIT	GenBank	KF822617	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
GQ121365	Bernotiené i Stunžėnas 2009	LIT	GenBank	KF822618	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
GQ121366	Bernotiené i Stunžėnas 2009	LIT	GenBank	KF822619	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
GQ121367	Bernotiené i Stunžėnas 2009	LIT	GenBank	KF822620	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
KF551252	Bernotiené i Stunžėnas 2009	LIT	GenBank	KF822621	Kúdela i sar., 2014	SLO	GenBank
GQ121362	Bernotiené i Stunžėnas 2009	LIT	GenBank	EU025952	Day i sar., 2008	ENG	GenBank

PRILOZI



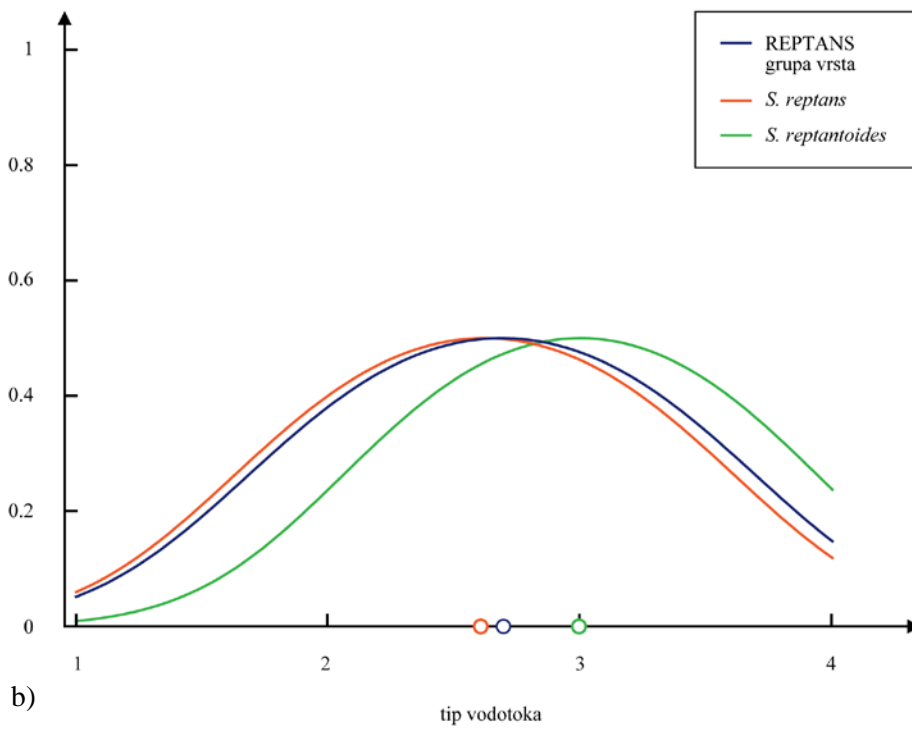
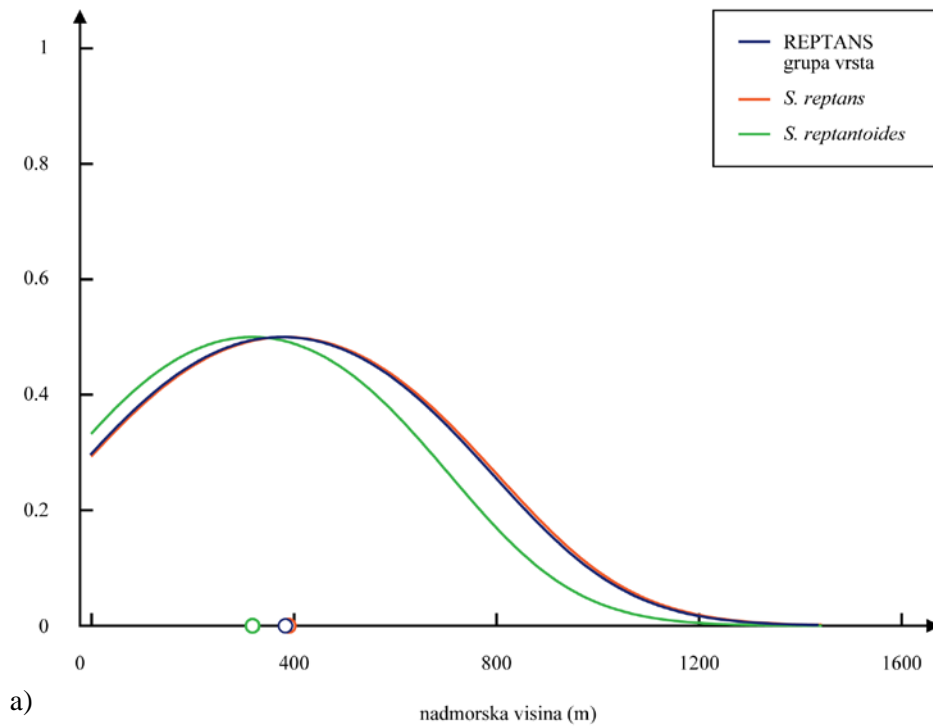
Prilog 4. Očekivane (Exp.) i dobijene (Obs.) vrednosti *mismatch* distribucije za klade (potencijalne vrste) podroda *Wilhelmia*.

PRILOZI



Prilog 5. Ekološka diferencijacija EQUINUM grupe vrsta sa najčešće zabeleženim vrstama u odnosu na a) nadmorsku visinu i b) tip vodotoka. Krive odgovora analiziranih vrsta prikazuju verovatnoću nalaženja vrsta duž gradijenta. Krugovi predstavljaju optimalnu vrednost za svaku od vrsta unutar grupe, kao i za samu EQUINUM grupu.

PRILOZI



Prilog 6. Ekološka diferencijacija REPTANS grupe vrsta sa najčešće zabeleženim vrstama u odnosu na a) nadmorsku visinu i b) tip vodotoka. Krive odgovora analiziranih vrsta prikazuju verovatnoću nalaženja vrsta duž gradijenta. Krugovi predstavljaju optimalnu vrednost za svaku od vrsta unutar grupe, kao i za samu REPTANS grupu.

Biografija

Jelena Đuknić rođena je 05.02.1984. godine u Beogradu. Pohađala je gimnaziju „Sveti Sava“, koju je završila odličnim uspehom 2003. Osnovne akademske studije upisala je iste godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Biologija. Osnovne studije završila je 2013. sa opštim uspehom 8,48 a Diplomski rad sa nazivom „Faunistički i ekološki sastav zajednice makroinvertebrata u rekama Vrelskoj Padini i Ivanštici (Istočna Srbija)” ocenjen je ocenom deset. Doktorske akademske studije Jelena Đuknić upisala je školske 2013. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, modul Entomologija.

Od decembra 2014. godine Jelena Đuknić zaposlena je na Odeljenju za hidroekologiju i zaštitu voda na institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja. Naučno-istraživačka delatnost Jelene Đuknić usmerena je na hidroekologiju slatkovodnih ekosistema sa posebnim interesovanjem za makroinvertebrate, pre svega Diptera i Simuliidae koje je istraživala u okviru doktorske disertacije. Tokom svog naučno-istraživačkog rada, Jelena Đuknić objavila je ukupno 47 bibliografsku jedinicu, od toga 11 radova M20 kategorije, tri rad u M50 kategoriji i 33 saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima. Radovi Jelene Đuknić do sada su citirani 65 puta prema bazi *Scopus* (bez autocitata), a h-indeks bez autocitata prema *Scopus*-u iznosi 4. U do sada objavljenim bibliografskim jedinicama, Jelena Đuknić je prvi autor u dva rada M20 kategorije, koja su proistekla iz doktorske disertacije.

Tokom rada u okviru odeljenja za hidroekologiju i zaštitu voda učestvovala je u realizaciji dva nacionalna projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, a takođe i na nekoliko međunarodnih projekata.