

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Ivana V. Budinski

Genetička struktura populacija sredozemnog
potkovičara *Rhinolophus euryale* Blasius, 1853
u Srbiji i filogeografija ove vrste na
Balkanskom poluostrvu

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Ivana V. Budinski

Population genetic structure of the
Mediterranean horseshoe bat *Rhinolophus*
euryalae Blasius, 1853 in Serbia and
phylogeography of this species on the Balkan
peninsula

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

MENTORI

dr Mladen Vujošević, naučni savetnik u penziji
Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

dr Dragana Cvetković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

dr Mladen Vujošević, naučni savetnik u penziji
Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

dr Dragana Cvetković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

dr Jelena Blagojević, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u Odeljenju za genetička istraživanja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu. Istraživanja su rađena u okviru projekta osnovnih istraživanja Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (broj projekta 173003) kojim je rukovodio dr Mladen Vujošević.

Deo podataka o distribuciji vrste u Srbiji je prikupljen prilikom terenskih istraživanja u okviru projekta „Monitoring skloništa i populacija slepih miševa Chiroptera u Srbiji“ (broj 401-00-200/2016-17) kojim je rukovodio dr Milan Paunović iz Prirodnjačkog muzeja u Beogradu.

Veliki broj ljudi je na razne načine bio uključen u izradu ove doktorske disertacije. Mnogi su pomagali u terenskim istraživanjima, a veliki broj kao tehnička i moralna podrška prilikom rada u laboratoriji, analiza rezultata i pisanja radova i teze.

Zbog toga veliku zahvalnost dugujem:

Dr Mladenu Vujoševiću, kao mentoru i kao dugogodišnjem rukovodiocu našeg odeljenja, na poverenju i podršci tokom svih ovih godina. Hvala što ste dozvolili da na odeljenje „uvedem“ novi predmet istraživanja. Takođe hvala na razumevanju za sve paralelne „projekte“ koje sam u međuvremenu radila, i podršci da odem na studentske boravke u inostranstvo.

Mentorki prof. dr Dragani Cvetković na konstruktivnim savetima, rešavanju birokratskih procedura na fakultetu i razumevanju prilikom završavanja mojih ispitnih obaveza.

Dr Jeleni Blagojević za podršku tokom svih ovih godina, za sve smernice i savete prilikom osmišljavanja teze, i za svu pomoć tokom laboratorijskog rada – zajedno smo izvojevale silne bitke sa hemikalijama i sekvenatorom.

Zahvaljujem se kolegama hiropterolozima Branku Karapandži i dr Milanu Paunoviću koji su me uveli u svet slepomišologije, Jeleni i Vukašinu Josipović na prijateljstvu i svim zajedničkim terenima i avanturama.

Veliko hvala svima koji su pomagali prilikom terenskih istraživanja: Marini Radonjić i Maji Hodžić na dobrom društvu i pomoći prilikom terena u Crnoj Gori; studentima iz NIDSBE „Josif Pančić“ iz Novog Sada, BID „Josif Pančić“ iz Beograda, BIUS iz Zagreba, IDSB iz Skopja; speleolozima iz ASAK-a i ostalih klubova iz Beograda, kao i speleolozima iz Bora, Zaječara i Valjeva.

Zahvaljujem se kolegama koji su prikupili materijal iz drugih država: Primožu Presetniku, Heliani Dundarovoj, Bojanu Petrovu i Luki Cistrone. Hvala dr Sebastienu

Puechmaille za poslate sekvence prajmera za analize D-petlje i kolegama dr Jeleni Aleksić, dr Marku Rakoviću i dr Emri Çoramanu za savete prilikom analiza.

Veliku zahvalnost dugujem dragim kolegama sa odeljenja: dr Vidi Jojić sa kojom sam započela saradnju još za vreme master studija, i koja je od samog početka verovala u mene, dr Vanji Bugarski-Stanojević koja me je naučila kako da puštam PCR i elektroforezu, dr Gorani Stamenković na svim praktičnim savetima vezanim za rad u laboratoriji. Dr Tanji Adnađević na društvu na terenima, na svim kritikama i savetima „iskusnije koleginice koja je već prošla sve ovo“, dr Mariji Rajičić, vernoj saputnici za vreme „doktorantskog perioda“, koja je uvek vedrila atmosferu u kancelariji i laboratoriji i uspešno razbijala predrasude o molekularcima na terenu. Dr Vladimiru Jovanoviću, koji me je kao srednjoškolca poveo na prvi teren i za koga volim da kažem da je „kriv“ za moj razvojni put kao biologa i naučnika, i koji je uvek bio raspoložen za proputovanja po zabačenim delovima Srbije da bih ja posetila lokalitete za koje smo samo čuli da postoje. Branki Pejić, sa kojom sam poslednjih godina provela najviše vremena po terenima i planinama; koja je još od studentskih dana uvek na pitanje „Hoćeš li na teren?“ odgovarala sa „Hoću“, koja nikad nije kasnila i bila najbolji suvozač i navigator. Hvala ti što si mi bila i desna i leva ruka, a često i glas razuma.

Zahvaljujem se kolegama sa drugih odeljenja IBISS-a, a posebno dr Mihailu Jeliću na konstruktivnim diskusijama oko rezultata koje nisam umela da protumačim i konstantnoj podršci u poslednjoj fazi izrade ove teze.

Veliko hvala svim prijateljima koji su bili uz mene sve ove godine. Hvala Vam na podršci, razumevanju i savetima kad sam kukala, brojnim večerima društvenih igara i pretrčanim kilometrima.

Ringrazio i colleghi del 'Wildlife Research Unit' di Portici per l'amicizia, le cose nuove che ho imparato e l'esperienza nella ricerca sui pipistrelli.

Agraeixo al Grup de Ratpenats del Museu de Ciències Naturals de Granollers per la seva amistat i el seu fantàstic ambient de treball durant la redacció d'aquesta tesi.

Najveću zahvalnost dugujem porodici, na bezrezervnoj ljubavi i podršci koju sam od njih imala tokom svih faza svog školovanja, koji su imali razumevanja za moja interesovanja, i koji su uvek bili tu kad mi je trebao oslonac i vetar u leđa.

Genetička struktura populacija sredozemnog potkovičara *Rhinolophus euryale* Blasius, 1853 u Srbiji i filogeografija ove vrste na Balkanskom poluostrvu

Sažetak

Genetička struktura populacija predstavlja rezultat efekta prošlih događaja kao što su prolazak populacija kroz usko grlo, postglacijalna ekspanzija, sekundarni kontakt, ali i recentnih događaja i fenomena koji obuhvataju migracije, filopatriju, socijalnost itd. Pleistocenske klimatske oscilacije uticale su na današnju distribuciju genetičkog diverziteta mnogih vrsta koje naseljavaju Evropu. Balkansko poluostrvo je prepoznato kao glacijalni refugijum za veliki broj vrsta umerenih područja, uključujući i određene vrste slepih miševa. Sredozemni potkovičar *Rhinolophus euryale* je rasprostranjen na širem području oko Sredozemnog mora. Najčešće koristi podzemna skloništa kao što su pećine, i zbog toga je njegova distribucija vezana za krečnjačke predele. Tokom leta se ženke grupišu u porodiljske kolonije gde se odvija koćenje i podizanje mladih, a jedinke oba pola se u jesen okupljaju u hibernacijske kolonije. Filopatrija je zabeležena kod jedinki oba pola. *R. euryale* se smatra sedentarnom vrstom jer između letnjih i zimskih skloništa retko prelazi udaljenosti veće od 50 km. U Srbiji se distribucija ove vrste poklapa sa krečnjačkim područjima u zapadnoj i istočnoj Srbiji.

Ciljevi ove doktorske disertacije bili su sistematizacija svih podataka o rasprostranjenosti ove vrste i evaluacija populacionih trendova u Srbiji; testiranje ISSR-PCR metode za brzo i pouzdano razlikovanje ove vrste i morfološki slične vrste *R. blasii*. Sekvence mitohondrijske D-petlje su korišćene za analizu genetičke varijabilnosti, demografske istorije i filogeografije ove vrste na Balkanskom poluostrvu. Pomoću mikrosatelitskih markera analizirana je genetička varijabilnost ove vrste u 12 populacija na području centralnog Balkana, testirana je genetička diferenciranost i procenjen protok gena između geografskih regiona. Pored toga, analiziran je stepen srodstva između jedinki unutar različitih tipova kolonija.

U periodu od 2012 do 2017. godine, sredozemni potkovičar je zabeležen na ukupno 26 lokaliteta u Srbiji (na 11 je zabeležen prvi put). Ovime je broj lokaliteta u Srbiji sa dokazanim prisustvom istraživane vrste porastao na 73. Pronađeno je nekoliko novih porodiljskih i hibernacijskih kolonija, kao i jedna letnja kolonija mužjaka.

Zabeleženo je samo jedno sklonište u građevini, dok su sva ostala bila u podzemnim objektima. Nisu identifikovani značajni faktori ugrožavanja, i procenjeno je da ova vrsta u Srbiji ima stabilan populacioni trend. Upotrebom ISSR-PCR markera je moguće brzo i sa velikom pouzdanošću razlikovati morfološki slične vrste srednjih potkovičara *R. euryale* i *R. blasii*. Ova studija predstavlja prvu populaciono-genetičku analizu sredozemnog potkovičara na području centralnog Balkana. Zabeležen je veliki diverzitet haplotipova D-petlje mitohondrijske DNK, i svi uzorci sa područja Evrope, Anadolije i Severne Afrike su se grupisali u jednu filogenetsku kladu. Dobijeni rezultati podržavaju scenario brze demografske ekspanzije, a procenjeno je da je ekspanzija počela krajem Pleistocena. Balkansko poluostrvo je najverovatnije predstavljalo jedan od refugijuma ove vrste u Evropi. Upotrebom mikrosatelitskih markera je takođe zabeležen veliki genetički diverzitet. Na analiziranom području postoji umereni nivo diferencijacije između geografskih regiona, i značajna izolacija putem distance. Genetička diferenciranost između populacija u zapadnoj i istočnoj Srbiji je bila mala ali značajna, što se može objasniti sedentarnošću i filopatrijom vrste. Populacija iz Crne Gore je genetički slična populacijama iz istočne Srbije, što ukazuje na potencijalno postojanje kolonija između tih regiona. Pokazano je da je stepen srodstva između jedinki unutar različitih tipova kolonija sličan. Mehanizmi koji leže u osnovi formiranja porodijskih kolonija su najverovatnije korist od grupne termoregulacije i prenos informacija o adekvatnim skloništima i lovnim teritorijama. Razmena informacija je takođe verovatno jedan od razloga grupisanja mužjaka u letnje kolonije.

U Balkanskim populacijama sredozemnog potkovičara zabeležen je veliki genetički diverzitet, kako na nuklearnom, tako i na mitohondrijskom nivou. Ove populacije sadrže značajni deo genetičkog diverziteta vrste, i prepoznate su kao najbrojnije i najstabilnije na celom arealu *R. euryale*. Očuvanje i zaštita balkanskih populacija sredozemnog potkovičara mogu imati krucijalni značaj u opstanku ove vrste.

Ključne reči: Chiroptera, D-petlja, filogeografija, izolacija putem distance, mikrosateliti, mtDNK, refugijum, *Rhinolophus euryale*, protok gena, srodstvo

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

UDK: [575.17+574.91]:599.423(043.3)

Population genetic structure of the Mediterranean horseshoe bat *Rhinolophus euryale* Blasius, 1853 in Serbia and phylogeography of this species on the Balkan peninsula

Abstract

The population genetic structure of a species is a result of past events such as bottlenecks, population expansion and secondary contact, as well as recent events and phenomena like migrations, philopatry, sociality etc. Climatic oscillations during the Pleistocene shaped the present distribution of genetic diversity of temperate biota in Europe. The Balkan peninsula has been recognized as a glacial refugium for many temperate species, including many bat species. The Mediterranean horseshoe bat *Rhinolophus euryale* is distributed in the Mediterranean area. It is predominantly cave-dwelling species and its distribution greatly overlaps with karstic regions. During summer females form nursery colonies where they give birth and rear pups, while in autumn both sexes gather together into hibernation roosts. Roost fidelity has been found in both sexes. *R. euryale* is considered to be a sedentary species, since the distance between summer and winter roosts is rarely greater than 50 km. Distribution of this species in Serbia overlaps with karstic areas in western and eastern Serbia.

The aims of this thesis were to gather all available data about species' distribution and to evaluate population trends in Serbia; testing ISSR-PCR method for reliable distinguishing this species from morphologically similar *R. blasii*. D-loop mitochondrial sequences were used for analyses of genetic diversity, demographic history and phylogeography of the Mediterranean horseshoe bat in the Balkan peninsula. Genetic variability of 12 populations in the central Balkans was analysed using nuclear microsatellites. Genetic differentiation and gene flow among populations from different geographic regions were estimated, and relatedness within different colony types was assessed.

In the period from 2012 to 2017, *R. euryale* was found at 26 localities in Serbia (11 localities for the first time), and now the number of localities counts 73. Several new nursery and hibernation colonies of this species were found, as well as one male summer colony. Only one roost was found in a building, while the rest were in underground sites.

No significant threats were identified, and the population trend of this species in Serbia is estimated to be stable. ISSR-PCR represents fast and reliable method for unambiguously distinguishing morphologically similar medium-sized horseshoe species *R. euryale* and *R. blasii*. This study represents first population genetic analysis of the Mediterranean horseshoe bat in the central Balkans. High haplotype diversity of mitochondrial D-loop sequences was found, and all samples from Europe, Anatolia and Northern Africa clustered within one phylogenetic clade. Obtained results support the scenario of a sudden demographic expansion, and it is estimated that this started in the late Pleistocene. The Balkan peninsula was probably one of the glacial refugia of this species in Europe. High genetic diversity was also found using nuclear microsatellites. Moderate genetic substructuring among geographic regions and significant isolation by distance were observed. Genetic differentiation among populations from western and eastern Serbia was small but significant, which can be explained by roost fidelity and non-migratory behaviour of the species. The population from Montenegro was genetically similar to ones from eastern Serbia, which implicates the potential existence of colonies between the analysed regions. Kinship is probably not a major factor driving grouping of females into nursery colonies, but, more likely, benefits from group thermoregulation and information transfer about suitable roosts and foraging areas. Information transfer is likely underlying the formation of male summer colonies.

High genetic diversity was found among Mediterranean horseshoe bat populations in the central parts of the Balkan peninsula, both for nuclear and mitochondrial markers. These populations harbour significant portion of species' genetic diversity, and they have been recognized as the most numerous and the most stable across the distribution of *R. euryale*. Therefore, protecting Balkan populations might play a vital role in conservation of Mediterranean horseshoe bat.

Key words: Chiroptera, D-loop, gene flow, isolation by distance, kinship microsatellites, mtDNA, refugium, *Rhinolophus euryale*, phylogeography,

Research area: Biology

Area of special interest: Genetics

UDC: [575.17+574.91]:599.423(043.3)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Slepí miševi (red Chiroptera)	2
1.1.1. Opšte karakteristike slepih miševa	2
1.1.2. Godišnji ciklus, kolonije i reprodukcija	4
1.1.3. Letenje i migracije	5
1.2. Genetička varijabilnost i molekularni markeri	7
1.2.1. Genetička varijabilnost	8
1.2.2. Mitohondrijska DNK	10
1.2.3. Mikrosateliti	11
1.2.4. ISSR markeri	12
1.3. Ledena doba i njihov uticaj na živi svet	12
1.3.1. Periodi glacijacije i interglacijacije u Evropi	12
1.3.2. Uloga glacijalnih refugijuma i putevi postglacijalnih ekspanzija	13
1.3.3. Filogeografija slepih miševa u Evropi	14
1.4. Sredozemni potkovičar <i>Rhinolophus euryale</i> Blasius, 1853	15
1.4.1. Opis vrste	15
1.4.2. Distribucija	16
1.4.3. Biologija vrste	17
1.4.4. Populacioni trendovi i ugroženost	18
1.4.5. <i>Rhinolophus euryale</i> u Srbiji	18
1.4.6. Genetičke analize populacija sredozemnog potkovičara	19
2. CILJEVI	21
3. MATERIJAL I METODE	23
3.1. Prikupljanje podataka o distribuciji <i>R. euryale</i> u Srbiji	24
3.2. Prikupljanje uzoraka za genetičke analize	24
3.3. Izolacija genomske DNK	26
3.4. ISSR-PCR	26
3.5. Mitohondrijska DNK	27
3.5.1. Uzorak i laboratorijske procedure	27
3.5.2. Analiza podataka	29
3.6. MIKROSATELITI	31
3.6.1. Uzorak i laboratorijske procedure	31
3.6.2. Analiza podataka	34
4. REZULTATI	37
4.1. Distribucija <i>R. euryale</i> u Srbiji	38
4.2. Genetičke analize ISSR-PCR	41

4.3.	Genetičke analize mitohondrijske DNK.....	42
4.4.	Genetičke analize mikrosatelita	47
5.	DISKUSIJA.....	61
5.1.	Distribucija i brojnost sredozemnog potkovičara u Srbiji	62
5.2.	Metode za identifikaciju.....	65
5.3.	Filogeografija i demografska istorija.....	66
5.4.	Genetička strukturiranost populacija	68
6.	ZAKLJUČCI.....	74
7.	LITERATURA	77
8.	PRILOZI	89

1. UVOD

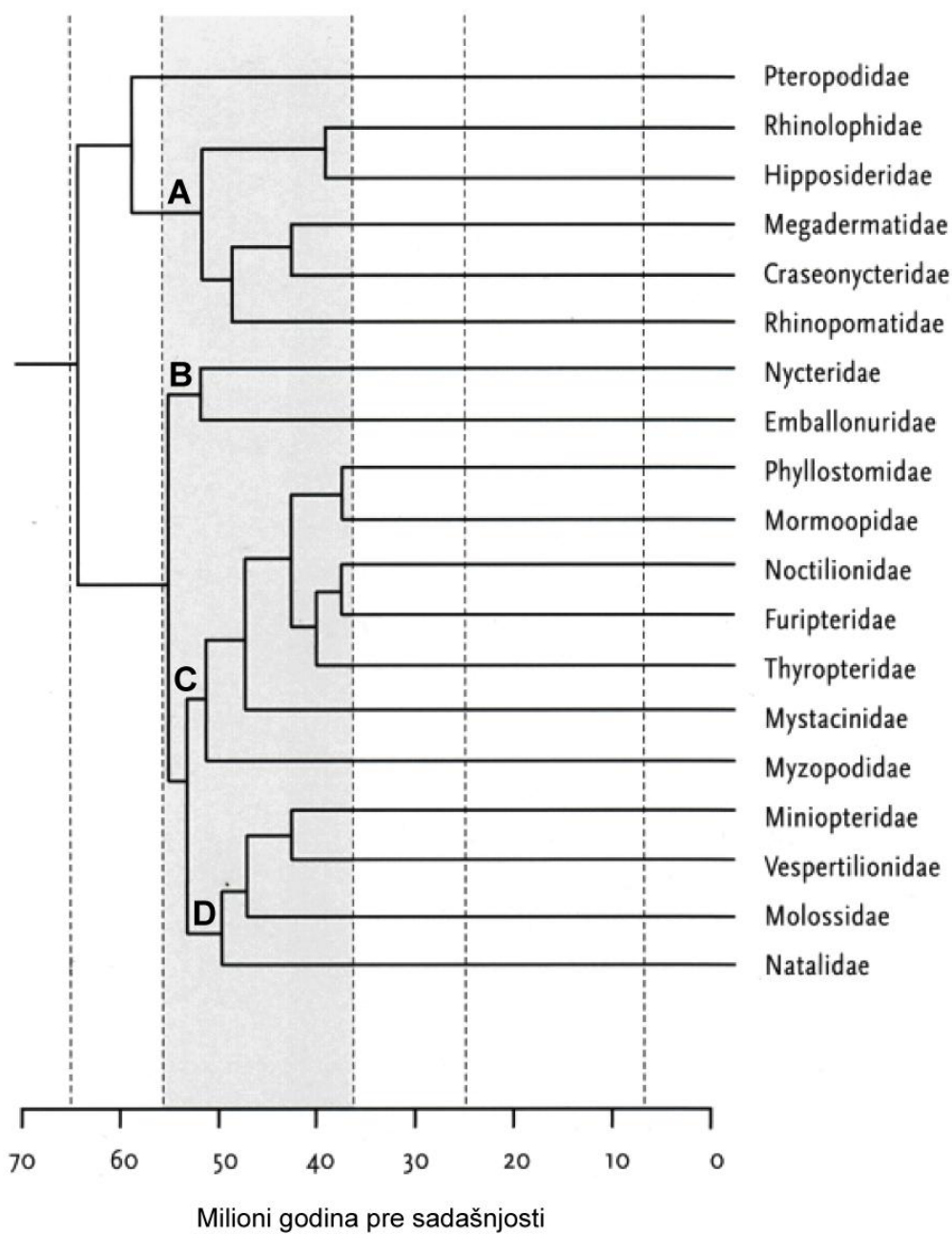
1.1. SLEPI MIŠEVI (red Chiroptera)

1.1.1. Opšte karakteristike slepih miševa

Slepi miševi (red Chiroptera) predstavljaju drugi najbrojniji red sisara posle glodara, i do sada je opisano oko 1400 vrsta (Burgin i sar. 2018) klasifikovanih u 19 porodica (Dietz i sar. 2009b). Naseljavaju najrazličitije tipove staništa, a rasprostranjeni su na svim kontinentima osim na Antarktiku (Simmons 2005b). Red slepih miševa je tradicionalno bio podeljen na dva podreda, Megachiroptera (= leteće lisice), podred koji je obuhvatao samo porodicu Pteropodidae, i Microchiroptera, u okviru koga su bile obuhvaćene sve ostale porodice slepih miševa. Međutim, nakon razvoja novih molekularnih i citogenetičkih metoda, poslednjih 20 godina je došlo do nekoliko reklasifikacija. Po trenutno važećoj klasifikaciji, slepi miševi su podeljeni u dve grupe: Yinpterochiroptera (klada A na Slici 1) i Yangochiroptera (klade B, C i D na Slici 1).

Poznato je relativno malo fosilnih ostataka slepih miševa, a na osnovu postojećih fosila i upotrebom molekularnih markera, procenjeno je da je divergencija u okviru ovog reda sisara počela u Eocenu, pre oko 50 miliona godina (Simmons 2005a). Većina slepih miševa ima sposobnost eholokacije, koju koriste za orijentaciju u prostoru i pronalaženje hrane. Eholokacija je razvijena kod svih osim predstavnika familije Pteropodidae, a i u okviru nje vrste iz roda *Rousettus* koriste neki vid eholokacije (proizvode specifičan zvuk lupkanjem jezika). Ishrana slepih miševa je izuzetno raznovrsna, srazmerno broju vrsta i diverzitetu ekoloških niša koje naseljavaju. Najveći procenat vrsta su insektivorne, dok ima vrsta koje se hrane drugim beskičmenjacima, voćem, polenom, ribama, žabama, pticama ili glodarima, a tri vrste se hrane krvlju (Altringham 2011).

Kod vrsta koje naseljavaju umerena klimatska područja parenje se odvija u jesen, pre hibernacije. Da bi sinhronizovali rađanje mladih sa najpovoljnijim vremenskim uslovima i maksimalnom količinom dostupne hrane, kod slepih miševa su razvijena dva mehanizma: prvi je odložena ovulacija i fertilizacija gde ženka čuva spermu u svom reproduktivnom traktu i do oplođenja dolazi nakon hibernacije, dok odložena implantacija embriona predstavlja drugi mehanizam.



Slika 1. Filogenetsko stablo recentnih porodica slepih miševa. Preuzeto iz Dietz i sar. (2009b) i modifikovano prema Simmons (2005a).

Ovaj red životinja prilagođenih na noćni način života karakteriše još nekoliko osobina kao što su sposobnost aktivnog letenja, visok stepen socijalnosti i specifične fiziološke adaptacije koje im omogućavaju dugovečnost (mogu da žive i do deset puta duže od glodara slične veličine (Dietz i sar. 2009; Altringham 2011).

1.1.2. Godišnji ciklus, kolonije i reprodukcija

Veliki broj vrsta slepih miševa se grupiše u kolonije u kojima provode bar jedan deo svog godišnjeg reproduktivnog ciklusa (Kerth 2008). Kolonija je definisana kao grupa životinja koje su međusobno povezane bihevioralno i/ili genetički, a dele jedno ili više skloništa tokom određenog vremenskog perioda (Altringham 2011). Slepim miševima se tokom godine grupiše u kolonije različitog tipa (koje imaju različite funkcije), kao što su npr. reproduktivne i hibernacijske. Sastav kolonije se razlikuje između vrsta, a shodno funkciji, sastav kolonije (uzrasna struktura i odnos polova) i veličina variraju u okviru jedne vrste. Neke vrste formiraju kolonije u podzemnim skloništimama sa stabilnom mikroklimom kao što su pećine, napušteni rudnici ili kamenolomi, i te kolonije često čini veliki broj jedinki. Sa druge strane, neke vrste slepih miševa koriste mnogo efemernija skloništa koja su podložna fluktuacijama spoljašnje temperature, kao što su npr. duplje u drveću, prostor ispod kore drveća, ili prostor unutar savijenih listova, i te kolonije su po pravilu male (Altringham 2011).

U umerenim klimatskim zonama slepi miševi se tokom zime grupiše u hibernacijske kolonije u kojima su prisutne jedinke oba pola. Kod nekih vrsta se parenje odvija u hibernacijskim kolonijama, dok kod drugih hibernaciji prethodi period rojenja i parenja u prelaznim skloništimama (Dietz i sar. 2009b). Tokom leta se ženke grupiše u porodiljske kolonije u kojima se odvija koćenje i podizanje mladih (Burland i Worthington Wilmer 2001; Kerth 2008; Boston i sar. 2012). U tom periodu mužjaci ili žive solitarno, ili se, kod nekih vrsta, takođe grupiše u kolonije (Altringham i Senior 2005). Potencijalni razlozi zašto dolazi do polne segregacije tokom leta su verovatno različite termalne potrebe ili izbegavanje kompeticije za resurse između polova (Altringham 2011).

Predloženo je nekoliko faktora kao objašnjenje mehanizma grupisanja slepih miševa u kolonije, kao što su grupna termoregulacija (Neuweiler 1993), ograničenost resursa i odbrana od predatora (Kunz i Lumsden 2003; Kerth 2008), transfer informacija (Wilkinson 1992) i srodstvo (Kerth i sar. 2000). Iako su homeotermne životinje, heterotermija je široko rasprostranjena među slepim miševima (Altringham 2011). Heterotermija predstavlja ponašanje kada endotermne životinje tokom dana usporavaju

stopu metabolizma i spuštaju telesnu temperaturu zbog nedostatka hrane ili nepovoljnih sredinskih uslova (McKechnie i Mzilikazi 2011). Mnoge vrste koje naseljavaju umerene klimatske zone su tokom dana u stanju torpora, a aktivni su tokom noći (Geiser 1998). Ženke u periodu gravidnosti i laktacije izbegavaju stanje torpora zbog razvoja fetusa i produkcije mleka, i grupna termoregulacija je izuzetno značajna za njih u tom periodu zbog “uštede” energije (Pretzlaff i sar. 2010). To je verovatno jedan od glavnih razloga zašto se ženke kod većine slepih miševa tokom leta grupišu u kolonije (Kerth 2008; Altringham 2011). Ukoliko na određenom području postoji ograničen broj adekvatnih skloništa i resursa hrane, životinje su možda primorane da se grupišu u raspoloživim skloništima kao što su pećine ili duplje drveća, čak i ako nemaju nikakvu direktnu korist od života u takvim grupama (Kerth 2008). Privrženost skloništu (filopatija) je zabeležena kod velikog broja vrsta slepih miševa, a obično su ženke te koje se iznova vraćaju u sklonište/koloniju gde su rođene (Burland i Worthington Wilmer 2001). Među evropskim vrstama slepih miševa, ova pojava je zabeležena kod vrsta kao što su dugouhi večernjak *Myotis bechsteinii* (Kerth i sar. 2000), evropski veliki večernjak *M. myotis* (Castella i sar. 2001), obični resasti večernjak *M. nattereri* (Rivers i sar. 2005), smeđi dugoušan *Plecotus auritus* (Burland i sar. 2001), veliki potkovičar *Rhinolophus ferrumequinum* (Rossiter i sar. 2002). Ukoliko je kod ženki izražena natalna filopatija, a srodstvo među ženkama je mehanizam za grupisanje u porodiljske kolonije, očekivano je da stepen srodnosti među članovima kolonije bude veći nego u slučaju nasumičnog grupisanja (Kerth 2008; Boston i sar. 2012). Kod ženki *Rhinolophus ferrumequinum* je zabeležena jaka filopatija prema porodiljskim skloništima, i u okviru porodiljskih kolonija je ustanovljen visok stepen srodnosti u okviru majčinskih linija (Rossiter i sar. 2002). Radiotelemetrijom je ustanovljeno da ženke i njihove odrasle ćerke koriste ista skloništa i lovne teritorije, pa je moguće da su ženke naučile te informacije od majki (Rossiter i sar. 2002).

1.1.3. Letenje i migracije

Slepi miševi su jedini sisari koji imaju sposobnost aktivnog letenja (Simmons 2005b). Prilikom evolucije je došlo do izduživanja falangi prednjih ekstremiteta (=krilo), a između krila, tela i repa se nalazi letna membrana koja se naziva patagijum. Različite

vrste slepih miševa imaju različite veličine i oblik krila, što direktno reflektuje način leta i strategiju lova ovih životinja (Altringham 2011). Dva parametra kojima se najčešće opisuju veličina i oblik krila slepih miševa su „*wing loading*“ – *WL* i „*aspect ratio*“ – *AR* (Norberg i Rayner 1987). *WL* predstavlja odnos površine krila i veličine slepog miša, a izračunava se kao količnik težine životinje i površine letne membrane. *AR* je parametar kojim se opisuje oblik krila, a izračunava se tako što se podele kvadrat raspona krila i površina krila. Životinje koje imaju visoki *AR* karakterišu uska i duga krila, dok životinje sa niskim *AR* imaju krila koja su kratka i široka. Slepi miševi koji imaju kratka i široka krila lete sporo i imaju odlične manevarske sposobnosti. Takva krila su prilagođena letenju u zatvorenom sklopu vegetacije, dok životinje sa dugim i uskim krilima lete brzo i na otvorenom prostoru, imaju slabe manevarske sposobnosti (Norberg i Rayner 1987).

Migracija predstavlja regularno sezonsko kretanje populacija (najčešće u dva smera) između staništa ili regiona radi izbegavanja nepovoljnih klimatskih uslova, od kojih jedan najčešće obuhvata mesto gde se odvija reprodukcija (Fleming i Eby 2003; Moussy i sar. 2013). Za razliku od migracija, disperzijom se smatra kretanje u jednom smeru sa jedne lokacije na drugu, i najčešće uključuje kretanje jedinke dalje od mesta rođenja (Fleming i Eby 2003). Slepi miševi koji naseljavaju umerene klimatske zone migriraju između hibernacijskih i letnjih skloništa, ukoliko su oni prostorno odvojeni (Burland i Worthington Wilmer 2001). Do migracija dolazi u periodima kada su spoljašnje temperature niske, te je povećana potreba za energijom, a smanjeni resursi hrane (Altringham 2011). Iako je migratorno ponašanje uglavnom karakteristika vrsta u umerenim zonama, zabeleženo je i kod vrsta slepih miševa koje naseljavaju tropske predele, a najčešće je uslovljeno dostupnošću hrane (Burland i Worthington Wilmer 2001). Australijska vrsta *Pteropus poliocephalus* migrira jer dostupnost hrane varira zbog padavina (Eby 1991).

Neke vrste iz rodova *Nyctalus* i *Pipistrellus* hiberniraju u dupljama drveća, i zbog toga migriraju u južnije delove severne hemisfere gde su zime blaže. Za razliku od njih, pećinske vrste kao što su vrste iz rodova *Myotis* i *Rhinolophus* migriraju lokalno jer pećine imaju mnogo stabilniju mikroklimu tj. na njih mnogo manje utiču fluktuacije u spoljašnjim temperaturama. U slučaju nedostatka adekvatnih pećina, neke od tih vrsta su se prilagodile za hibernaciju u veštačkim podzemnim skloništimama kao što su tuneli i rudnička okna (Altringham 2011). Migratorne vrste odlikuju određene adaptacije krila

kao što su visoki AR i WL i zašiljeni vrhovi krila, dok sedentarne vrste obično imaju kratka i široka krila (Norberg i Rayner 1987). Prema klasifikaciji koju je dao Roer (1995), na osnovu distanci koje prelaze između zimskih i letnjih skloništa, slepi miševi se mogu svrstati u tri kategorije: sedentarne vrste, regionalni migranti i migranti na duge staze. Sedentarne vrste slepih miševa migriraju „lokalno” tj. između zimskih i letnjih skloništa prelaze svega nekoliko kilometara do nekoliko desetina kilometara. Regionalni migranti sezonski prelaze od sto do nekoliko stotina kilometara, dok su kod migranata na duge staze, kao što su obični noćnik *Nyctalus noctula* i šumski slepi mišić *Pipistrellus nathusii*, zabeležena sezonska kretanja u dužini od oko 1500, odnosno 1900 kilometara (Dietz i Kiefer 2016).

Migratorno ponašanje ima veliki efekat na genetičku strukturu populacija. Kod vrsta koje migriraju, najčešće je zabeležena mala strukturiranost populacija (svega 0-5% diferencijacije između međusobno udaljenih parova populacija), što ukazuje na veliki protok gena između tih populacija. Nasuprot tome, kod sedentarnih vrsta su često zabeleženi visoki stepeni diferenciranosti populacija zbog ograničenog protoka gena između njih, što može dovesti do izolacije putem distance (pregled u Burland i Worthington Wilmer 2001; Moussy i sar. 2013).

1.2. GENETIČKA VARIJABILNOST I MOLEKULARNI MARKERI

Poslednjih decenija je razvijen veliki broj molekularnih tehnika pomoću kojih se može detektovati varijabilnost na nivou DNK. Upoređivanjem genetičkih karakteristika između individua iz različitih populacija se može proceniti genetička strukturiranost populacija, stopa protoka gena između njih, srodnost jedinki unutar lokalnih populacija, itd. (Burland i Worthington Wilmer 2001; Johnson i sar. 2015). Mnoge molekularne tehnike su inkorporirane u biogeografske studije, i analizom odnosa između različitih genetičkih linija kao i njihove prostorne distribucije se može rekonstruisati evoluciona i demografska prošlost vrsta i populacija, i zaključiti koji su faktori doprineli oblikovanju njihove današnje distribucije (Avice 2000).

Genetički markeri predstavljaju nasledne karaktere (lokuse), i kod diploidnih organizama svaka individua ima jedno ili dva različita stanja (alela) po lokusu (Sunnucks 2000). Velikom razvoju molekularnih markera su doprineli upotreba lančane reakcije polimeraze (*Polymerase Chain Reaction – PCR*), primena evoluciono konzerviranih PCR prajmera, upotreba hipervarijabilnih mikrosatelitskih lokusa i rutinskog sekvenciranja mitohondrijske DNK (Sunnucks 2000). Većina molekularnih markera za analizu genetičke varijabilnosti se zasniva na PCR reakciji u kojoj se u kratkom vremenskom periodu od inicijalne vrlo male (nanogramske) količine DNK umnožava ciljani fragment u velikom broju kopija. Različiti molekularni markeri imaju različite karakteristike (različitu stopu mutacije, način nasleđivanja, informativnost itd.), i odabir adekvatnog markera zavisi od predmeta istraživanja, i pitanja na koje se traži odgovor. Za rasvetljavanje filogenetskih odnosa između genetičkih linija na intra- i interspecijskom nivou, kao i za filogeografske studije se najčešće koriste sekvence mitohondrijske DNK, dok se za analize recentnog protoka gena, srodnosti, roditeljstva i populacione strukture najčešće koristi više lokusa visoko polimorfni markera kao što su mikrosateliti, SNP-ovi (engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*), nuklearni introni ili multi-lokusni markeri kao što su AFLP (engl. *Amplified Fragment Length Polymorphism*), ISSR (engl. *Inter Simple Sequence Repeat*) i drugi (Allendorf i Luikart 2007).

1.2.1. Genetička varijabilnost

Genetička struktura populacija jedne vrste predstavlja rezultat efekta recentnih događaja i fenomena kao što su disperzija, migracija, filopatrija, socijalnost i različite reproduktivne strategije, i prošlih događaja kao što su kontrakcija i ekspanzija areala, prolazak populacija kroz usko grlo, sekundarni kontakt itd. (Hewitt 1999). To znači da se genetička struktura populacija posmatra u prostornim i vremenskim okvirima. Prirodne populacije većine vrsta su podeljene na više lokalnih populacija (subpopulacija). Ukupna genetička varijabilnost unutar vrste (H_T) se može sagledavati na dva nivoa: kao genetičke razlike između jedinki unutar lokalnih populacija (H_S), i kao genetičke razlike između njih (Nei 1977). Genetički diverzitet predstavlja ukupnu količinu genetičke varijabilnosti u populaciji, genetička diferencijacija odražava distribuciju varijabilnosti između

različitih populacija, dok se genetičkom distancom kvantifikuje stepen varijabilnosti između dve konkretne populacije (Altringham 2011).

Najčešće korišćena mera za kvantifikovanje genetičke varijabilnosti između različitih populacija je ukupna heterozigotnost (H), koja predstavlja prosečnu proporciju individua koje su heterozigotne za analizirane lokuse, a može imati vrednosti između 0 i 1. Dve različite mere heterozigotnosti koje se koriste u populacionim studijama su dobijena (H_O) i očekivana (H_E) heterozigotnost. Srednja dobijena heterozigotnost predstavlja broj heterozigota po lokusu podeljen sa ukupnim brojem analiziranih jedinki, dok se očekivana heterozigotnost izračunava kao teorijsko očekivanje koje podrazumeva slučajno ukrštanje u populaciji. Druga često korišćena mera je polimorfnost, koja predstavlja proporciju lokusa koji su genetički polimorfni (imaju više od jednog alela). Ukupan broj alela po lokusu (N_A) se takođe koristi kao mera genetičke varijabilnosti, a pošto u velikoj meri zavisi od veličine uzorka, za upoređivanje različitih populacija se koristi bogatstvo alela (R), parametar koji uzima u obzir veličinu uzorka (El Mousadik i Petit 1996).

Najstariji i najrasprostranjeniji metod za izračunavanje genetičke diferencijacije među populacijama je F statistika (Wright 1951), koja se zasniva na razlikama u heterozigotnosti u odnosu na očekivane vrednosti ako su populacije u stanju Hardi-Vajnbergove ravnoteže. Genetička diferenciranost se kvantifikuje na nekoliko nivoa upotrebom sledećih koeficijenata: F_{IS} , F_{ST} i F_{IT} . F_{IS} predstavlja meru odstupanja od Hardi-Vajnbergove ravnoteže unutar lokalnih populacija, F_{ST} predstavlja meru razlika frekvencije alela između lokalnih populacija, dok F_{IT} predstavlja ukupno odstupanje od Hardi-Vajnbergovih proporcija na nivou cele osnovne populacije (ili vrste) koje može biti uzrokovano neslučajnim ukrštanjem unutar lokalnih populacija (F_{IS}), ili zbog razlike alelskih frekvencija između njih (F_{ST}) (Allendorf i Luikart 2007).

F_{ST} je najčešće korišćena mera genetičke diferenciranosti između populacija, a zasniva se na poređenju očekivane heterozigotnosti unutar i između subpopulacija. Postoji nekoliko metoda za izračunavanje, kao što su F_{ST} (Weir i Cockerham 1984), G_{ST} (Nei 1987), R_{ST} (Slatkin 1995) itd. Vrednosti F_{ST} mogu biti između 0 i 1; niskim stepenom genetičke diferenciranosti se smatraju vrednosti 0-0.05, vrednosti 0.05-0.15 ukazuju na umerenu, a vrednosti 0.15-0.25 na veliku diferenciranost između populacija, dok se

vrednosti veće od 0.25 smatraju pokazateljima veoma velike genetičke diferenciranosti između populacija (Hartl i Clark 1997). U poslednje vreme su se pojavile kritike F-statistike kada se radi o analizama visoko polimorfnih lokusa (Meirmans i Hedrick 2011), koja može da dovede do pogrešnih rezultata i interpretacije strukturiranosti populacija. Razvijene su nove metode za izračunavanje stepena genetičke diferenciranosti između populacija, kao što su J (Jost 2008) i G''_{ST} (Meirmans i Hedrick 2011) parametri. Wright (1943) je prvi put uveo u upotrebu pojam „izolacija putem distance“. Prema toj teoriji dolazi do većeg protoka gena između populacija koje su geografski bliže, u odnosu na udaljenije i izolovanije populacije, i očekivano je da su populacije koje su geografski udaljenije međusobno više genetički diferencirane.

1.2.2. Mitohondrijska DNK

Mitohondrijska DNK (mtDNK) je relativno mali (oko 16000 baza kod kičmenjaka) cirkularni molekul DNK koji je haploidan, karakteriše ga odsustvo rekombinacija, i nasleđuje se uglavom po majčinskoj liniji (Avisé 2000). U tkivima postoji veliki broj kopija mtDNK, i mogu se uspešno umnožiti fragmenti i iz muzejskog materijala ili fosilnih ostataka. U poređenju sa jedarnim genomom, mtDNK karakteriše relativno visoka stopa mutacija, i polimorfizam se smatra neutralnim u većini slučajeva. Zbog odsustva rekombinacija između DNK molekula, svaki predstavlja uniparentalno nasleđen haplotip, koji u velikoj meri oslikava demografske događaje u populacionoj istoriji vrste (Beebe i Rowe 2008). Ove osobine čine molekul mtDNK „jedinstvenom nerekombinujućom genealoškom jedinicom sa više alela ili haplotipova“ (Avisé 2004). Distribucija haplotipova se može koristiti za rekonstrukciju rasprostranjenja populacija u prošlosti, kao i događaja koji su uticali na oblikovanje recentne distribucije, kao što su npr. post-glacijalna rekolonizacija, prolazak populacija kroz usko grlo itd. (Ruedi i sar. 2008).

Prema hipotezi „molekularnog sata“ (neutralna teorija), predviđa se da su stope mutacije mtDNK relativno konstantne, i da se mutacije akumuliraju tokom vremena, pa se na osnovu stepena molekularne divergencije između vrsta (ili genetičkih linije unutar jedne vrste) može proceniti vremenski period kada je došlo do razdvajanja između njih

(Hamilton 2009). Iako mtDNK evoluirala brže od nuklearnog genoma, stopa mutacije je različita za različite regione mitohondrijske DNK, te se prema tome različiti markeri koriste za rasvetljavanje filogenetskih odnosa na različitim taksonomskim nivoima. Npr. geni za 12S i 16S rDNK su konzervativniji i koriste se za filogenetske analize između viših taksonomskih kategorija. Za razliku od njih, mitohondrijski protein-kodirajući regioni, kao što su geni za citohrom oksidazu b (*Cytb*) i citohrom oksidazu I (*COI*), evoluiraju brže, i koriste se za filogenetske analize u okviru porodica, rodova i vrsta (Wan i sar. 2004). Ovi markeri se takođe koriste u taksonomiji, posebno u identifikaciji blisko srodnih vrsta koje se morfološki ne mogu razlikovati (Hebert i sar. 2003; Tobe i sar. 2010). Kontrolni region mitohondrijske DNK (D-petlja, engl. *D-loop*) je hipervarijabilni i glavni nekodirajući region animalne mitohondrijske DNK, i zbog visoke stope mutacija se najčešće koristi za filogenetske i filogeografske analize unutar vrste (Wan i sar. 2004).

1.2.3. Mikrosateliti

Mikrosateliti predstavljaju kratke tandemske ponovke (najčešće 1-6 nukleotida), koji mogu biti ponovljeni veliki broj puta, i nasumično su distribuirani u nuklearnoj DNK (Wan i sar. 2004; Allendorf i Luikart 2007). Obično se nalaze u nekodirajućim regionima nuklearne DNK, i stopa mutacije je daleko veća nego u kodirajućim regionima. To su visoko polimorfni markeri, a mutacije najčešće dovode do promene dužine, tj. do promene broja ponovaka (dodavanje ili delecija ponovka) (Allendorf i Luikart 2007). Mikrosateliti su kodominantni markeri koji se nasleđuju po Mendelovskim principima. Na individualnom nivou imaju dva alela (mogu biti u homozigotnom i heterozigotnom stanju), a na populacionom nivou mogu imati veliki broj alela (Wan i sar. 2004). Razvijanje mikrosatelitskih markera je inicijalno tehnički zahtevno i skupo, ali nakon razvijanja prajmera je često moguće korišćenje istih prajmera za analize genetičke varijabilnosti blisko srodnih vrsta jer su prajmerski regioni često konzervativni (Allendorf i Luikart 2007). Mikrosateliti su među najčešće korišćenim molekularnim markerima u populacionoj i konzervacionoj genetici i u molekularnoj ekologiji. Koriste se za analize genetičkog diverziteta i populacione strukture unutar jedne vrste, za utvrđivanje

recentnog protoka gena između populacija, roditeljstva i stepena srodstva među jedinkama (Allendorf i Luikart 2007; Altringham 2011).

1.2.4. ISSR markeri

ISSR (engl. *Inter Simple Sequence Repeat*) markeri predstavljaju molekularnu tehniku genotipizacije zasnovanu na varijabilnosti regiona između mikrosatelita. Sekvence se umnožavaju u PCR reakciji u kojoj se koristi samo jedan prajmer koji predstavlja ponovak di-, tri- ili tetranukleotida, i komplementaran je mikrosatelitskim sekvencama. Ove prajmerske sekvence su široko rasprostranjene u genomu, i ova tehnika omogućava skrining genetičke varijabilnosti bez prethodnih informacija o DNK (Borner i Branchard 2001). ISSR markeri se koriste u populacionim i filogenetskim studijama (Zietkiewicz i sar. 1994; Bugarski-Stanojević i sar. 2011), a mogu se koristiti i za identifikaciju morfološki sličnih vrsta (Balasaravanan i sar. 2006; Maltagliati i sar. 2006; He i sar. 2007; Bugarski-Stanojević i sar. 2013).

1.3. LEDENA DOBA I NJIHOV UTICAJ NA ŽIVI SVET

1.3.1. Periodi glacijacije i interglacijacije u Evropi

Za vreme Pleistocena (poslednjih 2.5 miliona godina) u Evropi su se dešavale velike periodične klimatske fluktuacije koje su se sastojale od ponovljenih faza zahlađenja i otopljanja, odnosno glacijalnih (ledena doba) i interglacijalnih perioda (Webb i Bartlein 1992). Ove oscilacije su ostavile duboki trag na biodiverzitet Palearktika, na distribuciju vrsta i generički diverzitet (Taberlet i sar. 1998; Hewitt 1999). Za vreme perioda glacijacije, veliki deo severne i centralne Evrope je bio pod ledenim pokrivačem. Tokom poslednjeg glacijalnog maksimuma (*LGM – Last Glacial Maximum*, pre oko 23000-18000 godina) permafrost se protezao do južnih delova Francuske i Nemačke, a velike ledene kape su pokrivala Pirineje, Alpe i Kavkaz (Hewitt 1999; Randi 2007; Provan i Bennett 2008).

Za vreme ledenih doba u Evropi, areali većine vrsta umerenih područja su bili drastično smanjeni i ograničeni na južna poluostrva, kao što su Pirinejsko (Iberijsko), Apeninsko (Italija) i Balkansko poluostrvo. Širenje na zapad je bilo ograničeno Atlantskim okeanom, na jug Sredozemnim i Crnim morem, a na istok pustinjama i planinama Bliskog istoka (Hewitt 1996). U periodima interglacijacije je dolazilo do širenja areala na sever, što je bilo praćeno ponovnom kontrakcijom u refugijalna područja za vreme ledenih doba. Nakon poslednjeg glacijalnog maksimuma, populacije koje su preživle rekolonizovale su ostatak Evrope (Hewitt 1999). Tri glavna glacijalna refugijuma u Evropi u Pleistocenu su bila Pirinejsko, Apeninsko i Balkansko poluostrvo, a Hewitt (1999) navodi i verovatno postojanje refugijalnog područja u predelima Kavkaza, i/ili oko Kaspijskog mora.

Ponovljeni ciklusi kontrakcije u i ekspanzije iz glacijalnih refugijuma su bili sinhronizovani sa ciklusima glacijacije i interglacijacije, i imali su veliki efekat na genetički diverzitet vrsta (Hewitt 1999). Izolovane populacije koje su preživle u različitim refugijuma su se diferencirale u alopatriji za vreme glacijacija jer između njih nije bilo protoka gena. U periodima interglacijacije su se odatle širile na sever prateći različite kolonizacione putanje (Hewitt 2004; Randi 2007). Prema tom modelu je maksimalni genetički diverzitet očuvan u ancestralnim refugijalnim populacijama, a smanjuje se prema severu (Hewitt 2004). Ovakav obrazac je zajednički za veliki broj evropskih vrsta koje naseljavaju umerena klimatska područja (Hewitt 1999; Randi 2007).

1.3.2. Uloga glacijalnih refugijuma i putevi postglacijalnih ekspanzija

Glacijalni refugijumi u Evropi su imali različite uloge u rekolonizaciji kod različitih vrsta biljaka i životinja. Sumirani rezultati ispitivanja brojnih vrsta u Evropi pokazuju da je Balkansko poluostrvo predstavljalo najveći izvor genetičkog diverziteta, zatim Pirinejsko poluostrvo, dok je Apeninsko poluostrvo imalo najmanji doprinos. Uzrok tome su najverovatnije planinski masivi Pirineja i Alpa koji se protežu u smeru zapad-istok, i verovatno su predstavljali fizičke barijere za ekspanziju iz Pirinejskog, odnosno Apeninskog refugijuma (Hewitt 2011).

Na osnovu različitog doprinosa refugijalnih područja u post-glacijalnoj rekolonizaciji Evrope, Hewitt (1999) je opisao tri osnovna obrasca koje je nazvao paradigama. Prema paradigmi „skakavca“ (engl. *grasshopper paradigm*), većinu Evrope su rekolonizovale populacije sa Balkanskog poluostrva, dok su se iberijske i italijanske populacije zadržale na tim poluostrvima, jer je njihovo širenje na sever verovatno bilo onemogućeno Pirinejima i Alpima. Prema paradigmi „ježa“ (engl. *hedgehog paradigm*), populacije koje su se diferencirale u iberijskom, apeninskom i balkanskom refugijumu su rekolonizovale zapadnu, centralnu odnosno istočnu Evropu. Širenje Italijanskih populacija je najverovatnije bilo omogućeno zbog sporije ekspanzije populacija sa Balkana. Prema paradigmi „medveda“ (engl. *bear paradigm*) Evropa je posle ledenih doba rekolonizovana populacijama iz Pirinejskog i Kavkazkog/Karpatskog refugijuma, a te dve linije su se susrele u centralnoj i severnoj Evropi. Širenje iz Apeninskog refugijuma je verovatno bilo onemogućeno Alpima, a iz Balkanskog zbog brze ekspanzije iz drugih refugijuma.

1.3.3. Filogeografija slepih miševa u Evropi

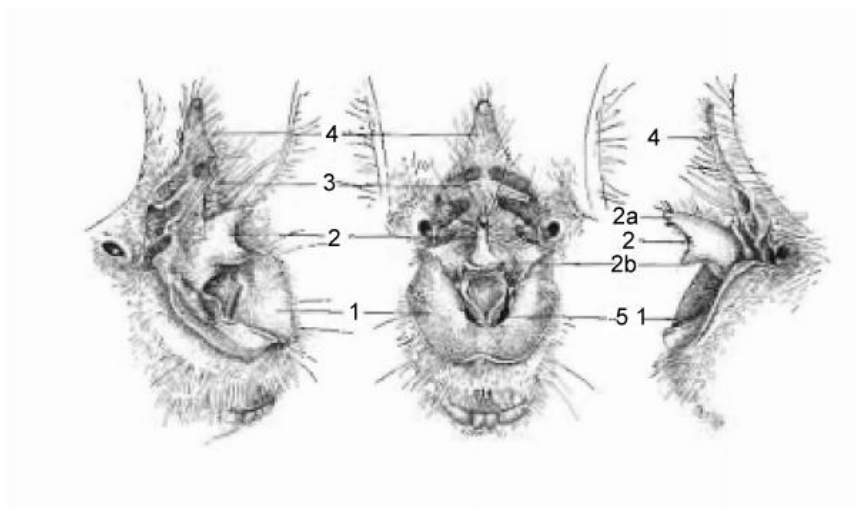
Tokom poslednjih dvadeset godina, brojne studije su se bavile istraživanjem filogeografije evropskih vrsta slepih miševa, kao što su evropski širokoušan *Barbastella barbastellus* (Rebelo i sar. 2012), evropski dugokrilaš *Miniopterus schreibersii* (Furman i sar. 2010; Bilgin i sar. 2016), dugouhi večernjak *Myotis bechteinii* (Kerth i sar. 2008), evropski veliki večernjak *M. myotis* (Ruedi i sar. 2008), obični noćnik *Nyctalus noctula* (Petit i sar. 1999), mali noćnik *N. leisleri* (Boston i sar. 2015), sivi dugoušan *Plecotus austriacus* (Razgour i sar. 2013), sredozemni potkovičar *Rhinolophus euryale* (Bilgin i sar. 2008; Najafi i sar. 2018), veliki potkovičar *R. ferrumequinum* (Bilgin i sar. 2009; Flanders i sar. 2009), mali potkovičar *R. hipposideros* (Dool i sar. 2013), i kod većine su zabeleženi tragovi postglacijalne ekspanzije iz južноеvropskih refugijuma. Za veliki broj evropskih vrsta slepih miševa su Pirinejsko i Balkansko poluostrvo predstavljali glavne genetičke izvore za post-glacijalnu rekolonizaciju, dok je Apeninsko poluostrvo imalo malu ulogu (Rebelo i sar. 2012). Balkansko poluostrvo je predstavljalo glavni, ili bar jedan od glacijalnih refugijuma za *B. barbastellus* (Rebelo i sar. 2012), *M. schreibersii*

(Furman i sar. 2010), *M. bechsteinii* (Kerth i sar. 2008), *P. auritus* (Juste i sar. 2004), *R. euryale* (Bilgin i sar. 2008) i *R. ferrumequinum* (Bilgin i sar. 2009).

1.4. SREDOZEMNI POTKOVIČAR *Rhinolophus euryale* Blasius, 1853

1.4.1. Opis vrste

Sredozemni potkovičar, *Rhinolophus euryale* Blasius, 1853 spada u grupu srednjih potkovičara. Kao morfološke diskriminativne karakteristike za razlikovanje vrsta potkovičara koriste se građa i oblik kožnih nosnih nabora (Slika 2) i odnos dužina falangi prstiju. Kod *R. euryale* krzno je relativno uniformne sivkasto-braon boje, malo svetlije sa ventralne strane. Gledano iz profila, gornji izraštaj sedla je zašiljen, malo povijen nadole i duži od donjeg izraštaja. Gledano od napred, lanceta se ravnomerno sužava prema vrhu. Druga falanga četvrtog prsta je više od dva puta duža od prve falange istog prsta (Dietz i Kiefer 2016).



Slika 2. Građa kožnih nosnih nabora kod potkovičara. 1 – potkovičar; 2 – sedlo; 2a – gornji izraštaj sedla; 2b – donji izraštaj sedla; 3 - transverzalni nabor ispod lancete; 4 – lanceta; 5 – nozdrva. Preuzeto i modificirano iz Schober i Grimmberger (1989).

Morfološki slične vrste su druge dve vrste srednjih potkovičara koje su prisutne u Evropi, tamnooki potkovičar *Rhinolophus mehelyi* i južni potkovičar *Rhinolophus blasii*. Kod *R. mehelyi* se, gledano od napred, lanceta naglo sužava pri vrhu, a gornji izraštaj *sella-e* je zaobljen i nije povijen prema dole. Kod *R. blasii* postoji usek na sredini kožnog nabora koji se nalazi ispod lancete, a druga falanga četvrtog prsta je manje nego dva puta duža od prve falange istog prsta (Dietz i Kiefer 2016). Eholokacioni signali sredozemnog potkovičara imaju karakterističan oblik za potkovičare (engl. *constant frequency – CF*) sa frekvencijom od 104-109 kHz, u Bugarskoj najčešće 105-106 kHz (Dietz i sar. 2009b).

1.4.2. Distribucija

Ova vrsta naseljava zapadni Paleartik (Slika 3), i najveći deo areala se nalazi u širem području oko Sredozemnog mora (Juste i Alcalde 2016). Naseljava severozapadne delove Afrike (Maroko, Alžir i Tunis), a u Evropi je rasprostranjen na Pirinejskom poluostrvu, u južnim delovima Francuske, Italiji, na području celog Balkanskog poluostrva i u Turskoj (Dietz i Kiefer 2016). Najseverniju granicu areala čine izolovane populacije u kraškim predelima Karpata između Mađarske i Slovačke, dok istočnu granicu čine područje istočnog Mediterana oko Levantskog mora, Kavkaz, Iran i Turkmenistan (Benda i sar. 2012; Uhrin i sar. 2012). Rasprostranjen je na većini mediteranskih ostrva osim na Kritu i Balearskim ostrvima, a veliki broj naučika osporava jedini nalaz ove vrste sa Kipra, uz obrazloženje da se najverovatnije radi o pogrešno identifikovanoj jedinki vrste *Rhinolophus mehelyi* (Dietz i Kiefer 2016; Juste i Alcalde 2016). Nalazi sredozemnog potkovičara su beleženi od nivoa mora do 1360 m n.v (Juste i Alcalde 2016).



Slika 3. Distribucija *Rhinolophus euryale* prema IUCN (Juste i Alcalde 2016)

1.4.3. Biologija vrste

Sredozemni potkovičar tokom leta najčešće koristi pećine kao skloništa, zbog čega je rasprostranjenje ove vrste u velikoj meri vezano za krečnjačka područja (Dietz i Kiefer 2016). Osim pećina koriste veštačka podzemna skloništa kao što su rudnici i tuneli, a u severnim delovima areala, zbog nedostatka prirodnih skloništa, oko 25% letnjih kolonija se nalazi na tavanima (Uhrin i sar. 2012). Zimska skloništa su uglavnom u podzemnim objektima, najčešće u pećinama, a ređe u rudnicima (Dietz i Kiefer 2016).

Pripadnici ove vrste se uglavnom hrane moljcima (Arrizabalaga-Escudero i sar. 2015), a lovne teritorije sredozemnog potkovičara predstavljaju listopadne šume i priobalna vegetacija (Russo i sar. 2002). U području Mediterana često love u maslinjacima i zasadima eukaliptusa, dok izbegavaju četinarske šume i otvorena staništa (Russo i sar. 2002; Aihartza i sar. 2003).

Tokom leta, ženke se grupišu u porodiljske kolonije koje u građevinama broje nekoliko desetina do nekoliko stotina jedinki, dok su kolonije u pećinama mnogo veće, u Bugarskoj čak i do 10000 jedinki (Dietz i Kiefer 2016). Jedinke oba pola krajem jeseni formiraju hibernacijske kolonije, koje uglavnom broje do 2000 jedinki (Juste i Alcalde 2016). Parenje se odvija u pećinama tokom jeseni i u hibernacijskim skloništim (Uhrin i sar. 1996; Dietz i Kiefer 2016).

Rhinolophus euryale se smatra sedentarnom vrstom, i predstavnici ove vrste uglavnom prelaze distance kraće od 50 km između letnjih i zimskih skloništa (Hutterer i sar. 2005). Najduža zabeležena migracija između letnjeg i hibernacijskog skloništa kod ove vrste u Bugarskoj je 58.8 km (Dietz i sar. 2009a), a u prošlosti su zabeležene svega dve izuzetno duge migracije za ovu vrstu: 83 km u Italiji (Dinale 1968) i 134 km u Francuskoj (Heymer 1964). Slično kao kod ostalih vrsta iz ovog roda, sredozemni potkovičar ima male vrednosti *WL* i *AR*, odnosno kratka i široka krila koja su prilagođena za let i manevrisanje u zatvorenom sklopu vegetacije, dok je let na duže distance energetski skup (Norberg i Rayner 1987; Burland i Worthington Wilmer 2001). Kod jedinki oba pola je zabeležena privrženost skloništima (Uhrin i sar. 2012; Pejić i sar. 2018), a najduži zabeleženi životni vek je 21 godina (Ibáñez i sar. 2018).

1.4.4. Populacioni trendovi i ugroženost

Poslednjih decenija je u velikom delu areala registrovano značajno opadanje brojnosti populacija sredozemnog potkovičara (Juste i Alcalde 2016). Jedinke ove vrste su izuzetno osetljive na uznemiravanje u skloništima, i nekada cele kolonije napuste pećine koje posećuju turisti ili speleolozi (Dietz i Kiefer 2016). Prema IUCN kriterijumima na svetskom nivou ima status skoro ugrožene vrste (*NT – Near threatened*), dok se na Evropskom nivou smatra ranjivom (*VU – Vulnerable*) (Barova i Streit 2018). Najbrojnije populacije koje ujedno imaju i stabilne populacione trendove se nalaze u centralnim i istočnim delovima Balkanskog poluostrva (Dietz i Kiefer 2016; Juste i Alcalde 2016).

1.4.5. *Rhinolophus euryale* u Srbiji

Distribucija *R. euryale* u Srbiji se poklapa sa krečnjačkim područjima (Paunović 2016), i recentni nalazi ove vrste su distribuirani u zapadnoj (Dinaridi) i istočnoj (Karpato-Balkanidi) Srbiji (Đurović 1998). Postoji nekoliko starih nalaza ove vrste u rudnicima južno od Beograda i u Šumadiji, ali u centralnim delovima zemlje nema puno adekvatnih skloništa (pre svega pećina), i nema recentnih nalaza ove vrste. Ova vrsta je

u Srbiji zabeležena na ukupno 62 lokaliteta, a procenjena brojnost populacije je oko 30000 jedinki (Paunović 2016; Burazerović 2017). Sva poznata skloništa ove vrste se nalaze u krečnjačkim područjima, i sva osim jednog se nalaze u pećinama (Paunović 2016; Budinski i sar. 2019a). Formiraju mešovite kolonije sa drugim vrstama srednjih potkovičara, a ponekad i sa *Myotis emarginatus* i *Miniopterus schreibersii* (Dietz i Kiefer 2016; Paunović 2016). Brojnost jedinki ove vrste je obično veća u hibernacijskim kolonijama u poređenju sa letnjim kolonijama, što je najverovatnije posledica grupisanja jedinki iz više manjih letnjih kolonija u veliko centralno zimsko sklonište (Paunović 2016). Osim poznatih porodiljskih i hibernacijskih skloništa ove vrste, poznata je i jedna muška letnja kolonija ove vrste koja postoji preko 20 godina. Muška kolonija se nalazi u pećini Bela Sala u istočnoj Srbiji, a prvi put je zabeležena 1996. godine. Obično broji oko 100 jedinki, i ponekad je mešovita sa *Rhinolophus blasii* (Uhrin i sar. 2012).

1.4.6. Genetičke analize populacija sredozemnog potkovičara

Rasvetljavanje evolucione istorije populacija *R. euryale* je do sada bilo predmet istraživanja dve studije. Bilgin i saradnici (2008) su uradili filogeografsku analzu populacija sa područja Anadolije i jugoistočne Evrope (evropski deo Turske, Bugarska i Grčka) primenom mitohondrijskih *D-loop* markera. Njihovi rezultati su pokazali postojanje dve jasno definisane monofiletske klade sa gotovo 10% divergencije na nivou analiziranog regiona. Haplotipovi iz prve klade su bili rasprostranjeni na celom analiziranom području, dok su haplotipovi iz druge bili zabeleženi samo na istoku. Autori su sugerisali da su u prošlosti na tom području postojala dva glacijalna refugijuma ove vrste. Jedan najverovatnije na Balkanu, a drugi dalje na istoku, verovatno na području Kavkaza ili oko Kaspijskog mora. Međutim, kasnije je ustanovljeno da su jedinke iz druge klade bile pogrešno identifikovane, i da haplotipovi iz druge klade pripadaju drugoj vrsti, *Rhinolophus blasii* (Bilgin, personalna komunikacija). Ovi podaci do sada nisu publikovani. Pokazano je da su populacije u okviru prve klade prošle kroz fazu ekspanzije nakon poslednjeg glacijalnog maksimuma.

Deset godina kasnije, Najafi i sar. (2018) su koristili dva mitohondrijska markera, *D-loop* i *Cytb* za filogeografske analize *R. euryale* na području Irana. Upotrebom oba markera su dobijeni rezultati koji ukazuju na postojanje dve monofiletske klade, koje odgovaraju različitim geografskim područjima u Iranu, a za koje se pretpostavlja da su za vreme ledenih doba evoluirale u različitim refugijumima. Jedan refugijum je najverovatnije postojao severno od planina Elborz, blizu obala Kaspijskog mora (ili eventualno na području Kavkaza), a kao drugi refugijalni region ove vrste u Iranu je predloženo područje južno od planina Zagroz (Najafi i sar. 2018).

2. CILJEVI

Imajući u vidu da je došlo do opadanja brojnosti populacija sredozemnog potkovičara u mnogim delovima evropskog areala, prvi cilj ove teze je bio objedinjavanje i sistematizacija svih do sada dostupnih podataka o distribuciji ove vrste u Srbiji, i evaluacija populacionih trendova i faktora ugrožavanja.

Sledeći cilj je bio testiranje da li se ISSR-PCR može koristiti kao brza i efikasna metoda za razlikovanje dve vrste morfološki sličnih srednjih potkovičara, sredozemnog potkovičara *Rhinolophus euryale* i južnog potkovičara *Rhinolophus blasii*.

Treći cilj ove teze je bio analiza genetičke varijabilnosti sredozemnog potkovičara na području Balkanskog poluostrva na osnovu mitohondrijskih sekvenci, i analiza filogenetskih i filogeografskih veza između populacija na Balkanu i populacija u Anadoliji i u Iranu. Takođe, ispitivana je demografska istorija ove vrste i testirana je hipoteza da je Balkansko poluostrvo predstavljalo jedan od glacijalnih refugijuma ove vrste u Pleistocenu.

Četvrti cilj je bila analiza genetičke varijabilnosti sredozemnog potkovičara na području centralnog Balkana upotrebom mikrosatelitskih markera. Takođe, s obzirom da ova vrsta rasprostranjena u zapadnoj i istočnoj Srbiji, da između letnjih i zimskih skloništa prelazi kratke distance i da pokazuje priverženost prema skloništima, testirana je genetička diferenciranost između populacija u zapadnoj i istočnoj Srbiji, i da li postoji izolacija putem distance.

Peti cilj ove teze je bila analiza stepena srodstva među članovima kolonija različitog tipa (porodiljske, letnje muške i hibernacijske) i testiranje da li se međusobno srodne jedinke češće grupišu u kolonije, odnosno da li je srodnost faktor koji promovise grupisanje u kolonije.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. PRIKUPLJANJE PODATAKA O DISTRIBUCIJI *R. euryale* U SRBIJI

Podaci o distribuciji *R. euryale* objedinjuju nekoliko izvora. Prvi obuhvata pregled literature i materijala iz studijske zbirke Prirodnjačkog muzeja u Beogradu sistematizovan u Paunović (2016). Pored toga, postoje publikovani dodatni nalazi sa područja istočne Srbije (Uhrin i sar. 2012; Burazerović 2017). Nekoliko novih nalaza ove vrste u Srbiji i okolnim zemljama je registrovano prilikom prikupljanja materijala za ovu doktorsku disertaciju. Prikupljanje podataka o distribuciji vršeno je standardnim metodama kao što su inspekcija potencijalnih skloništa, hvatanje životinja i akustična identifikacija. Inspekcija potencijalnih skloništa je obuhvatala pregledanje tunela, rudničkih okana i drugih napuštenih građevina, kao i poseta i pregledanje speleoloških objekata. Veliki broj pećina i jama je posećen od strane autora, kao i od strane speleologa iz nekoliko klubova u Srbiji i Bugarskoj, prilikom čega su pravljene fotografije pomoću kojih je identitet vrste bio naknadno utvrđen. Slepí miševi su hvatani standardnim metodama na ulazu u sklonište ili u samom skloništu (detaljnije u poglavlju Prikupljanje uzoraka za genetičke analize). Ultrazvučna detekcija je vršena na mnogim lokalitetima gde su rađeni transekti radi utvrđivanja prisustva slepih miševa, a isto tako i unutar skloništa gde su bile prisutne kolonije srednjih potkovičara, radi preciznije identifikacije same vrste. Eholokacioni signali su bili registrovani pomoću ultrazvučnog detektora Petterson D240X (Petterson Elektronik AD, Upsala, Švedska) i snimani pomoću ručnog snimača Zoom H2. Snimci su naknadno analizirani u softveru BatSound 4.03, a vrsta je identifikovana na osnovu karakteristične frekvencije i tipa signala (Russo i Jones 2002).

3.2. PRIKUPLJANJE UZORAKA ZA GENETIČKE ANALIZE

Prikupljanje uzoraka je vršeno u periodu 2012-2017. godine na teritoriji Srbije, Crne Gore i Bosne i Hercegovine. Dodatne uzorke iz Bosne i Hercegovine kao i uzorke iz Slovenije je prikupio Primož Presetnik iz Centra za kartografiju flore i faune Slovenije, a uzorke iz Albanije i Bugarske su prikupili Heliana Dundarova i Bojan Petrov iz Instituta za istraživanje biodiverziteta i ekosistema Bugarske Akademije Nauka. Uzorke iz Italije je prikupio Luca Cistrone. Hvatanje slepih miševa i prikupljanje uzoraka su realizovani uz dozvole izdate od strane nadležnih institucija u navedenim državama (Prilog 1).

Slepi miševi su hvatani pomoću standardnih vertikalnih mreža (Ecotone, Poljska) visina 2.5 m i dužine 3, 6, 7, 9 ili 12 metara. Mreže su bile postavljene na ulaz u sklonište (ili u njegovoj neposrednoj blizini) pre sumraka, i bile su otvorene nekoliko sati, ili tokom cele noći. U nekim skloništima su životinje hvatane upotrebom ručne mreže (meredova) unutar samog skloništa. Uhvaćene životinje su držane pojedinačno u platnenim vrećicama u što kraćem vremenskom periodu, nako čega je svaka jedinka identifikovana do nivoa vrste na osnovu morfoloških karaktera (Dietz i Kiefer 2016), utvrđen je pol, starost i reproduktivni status. Jedinke su grupisane u nekoliko starosnih kategorija (juvenilna jedinka, subadult ili adult) na osnovu stepena srastanja epifiza dugih kosti (Brunet-Rossini i Wilkinson 2009). Reproductivni status je određen na osnovu kategorija koje je dao Racey (2009). Za svaku ženku je zabeleženo da li se kotila (tekuće godine ili ranije), da li je gravidna, u laktaciji ili postlaktaciji, a za mužjaka da li je trenutno reproduktivno aktivan ili ne. Svakoј jedinki je izmerena dužina podlaktice pomoću nonijusa (preciznost 0.1 mm) i masa pomoću vagice (Pesola, preciznost 0.5 g). Uhvaćenim jedinkama su standardnom neinvazivnom metodom uzeti uzorci tkiva za genetičke analize. Sa oba plagiopatagijuma (deo letne membrane krila) je uzet po jedan *biopsy punch* („krpica“) kože prečnika 3 mm, koja je čuvana u 96 % etanolu (Worthington Wilmer i Barratt 1996).

Nakon identifikacije, merenja i uzimanja uzoraka za dalje analize, slepi miševi su bili markirani krilnim prstenovima Centra za markiranje životinja pri Prirodnjačkom muzeju u Beogradu (prstenovi B serije, proizvođača Porzana, Velika Britanija). Ženkama su prstenovi stavljeni na levu podlakticu, a mužjacima na desnu. Životinje su puštene odmah nakon procesuiranja (uz što kraće zadržavanje), na istom mestu gde su bile uhvaćene.

Tokom prikupljanja uzoraka za potrebe ove teze, od određenog broja jedinki su prikupljeni uzorci fecesa za virusološke analize i za analize ishrane. Uhvaćene jedinke su nakon vađenja iz mreže stavljene u sterilne papirne kese na kojima su napravljene perforacije, i ostavljene u njima 20-30 minuta zbog defekacije. Prikupljeni uzorci fecesa su stavljeni u tubice sa RNAsield ili PBS i zamrznuti. Virusološke analize su rađene na Odeljenju za virusologiju u Szentágothai istraživačkom centru Univerziteta u Pečuju, a analize ishrane na Odeljenju za evolucionu genomiku Univerziteta u Kopenhagenu.

3.3. IZOLACIJA GENOMSKE DNK

Genomska DNK je bila izolovana iz polovine ili cele „krpice“ kože upotrebom komercijalnih kitova za izolaciju Quick-gDNA Mini Prep Kit (Zymo-Research) i KAPA Express Extract Kit (Kapa Biosystems) prateći uputstva proizvođača. U slučaju Zymo-Research kita za izolaciju, tkivo je prethodno bilo inkubirano preko noći u digestivnom puferu sa proteinazom K na 55°C (Strauss 2001), a svi naredni koraci prilikom izolacije su rađeni po protokolu proizvođača. Koncentracija i kvalitet izolovane DNK su proveravani na spektrofotometru BioPhotometer (Eppendorf, Nemačka). Koncentracija je određivana merenjem apsorbance na 260 nm, a kvalitet odnosima apsorbanci na 260 i 280 nm, i 260 i 230 nm.

3.4. ISSR-PCR

Za preliminarno testiranje je korišćeno po 5 jedinki morfološki sličnih vrsta srednjih potkovičara, *Rhinolophus blasii* i *R. euryale*, od kojih je izolovana DNK umnožavana u PCR reakcijama sa 4 prajmera iz Bugarski-Stanojević i sar. (2011): (CAG)₄AC, (CAA)₅GC, (CAA)₄AC i (GA)₆GC. Upotrebom prajmera (CAA)₅GC su kao proizvod dobijeni species-specifični obrasci traka (jasno razlikovanje ove dve vrste), i taj prajmer je korišćen u daljim analizama. Ukupno je analizirano 20 jedinki vrste *Rhinolophus euryale* i 20 jedinki *R. blasii* (po 10 mužjaka i ženki od obe vrste, sa različitim lokaliteta). PCR reakcija je rađena u ukupnoj zapremini od 20 µl koja je sadržala 1 × Taq pufer sa (NH₄)₂SO₄ (Thermo Scientific™), 2.5 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs, 0.5 µM prajmera, 1 jedinicu DreamTaq polimeraze (Thermo Scientific™) i 1 µl izolovane DNK. Temperaturni uslovi reakcije su bili: 5 minuta inicijalne denaturacije na 94°C, 45 ciklusa koji su se sastojali od 30 s na 94°C, 30 s na 50°C, 90 s na 72°C koji su praćeni finalnom ekstenzijom u trajanju od 7 minuta na 72°C. Produkti PCR reakcije su bili razdvojeni procesom elektroforeze na 1.2% agaroznom gelu.

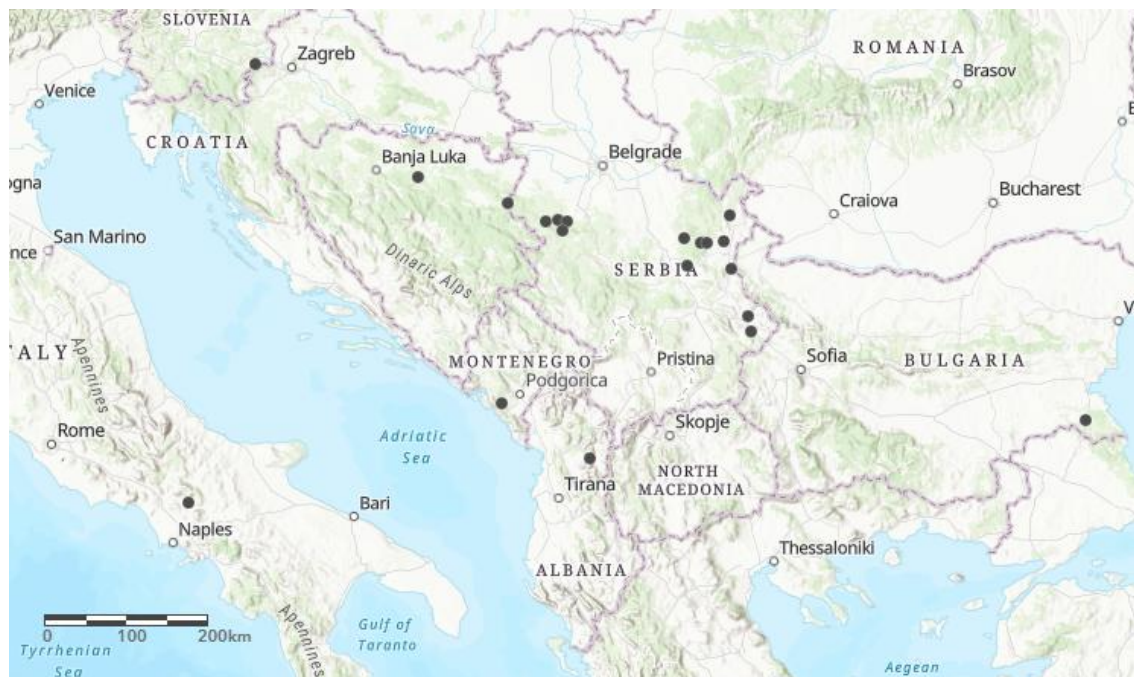
3.5. MITOHONDRIJSKA DNK

3.5.1. Uzorak i laboratorijske procedure

Varijabilnost mitohondrijske DNK je bila analizirana kod 82 jedinke prikupljene na 20 lokaliteta na Balkanu i u Italiji (Tabela 1, Slika 4). Upotrebom prajmera REM-DL-F1 (5'-AATCGGAGGCCAACCTGT-3') (Puechmaille, neobjavljeno) i mtDNA-F2-R (5'-ATGGCCCTGAAGAAAGAACCAGATG-3') (Puechmaille i sar. 2011) umnožen je fragment D-petlje mitohondrijske DNK u dužini od 711 baznih parova, koji obuhvata sekvence tRNK-Thr, tRNK-Pro i hipervarijabilni region (HV-1). Amplifikacija ciljanog fragmenta je rađena u PCR reakciji u finalnoj zapremini od 25 μ l koju je činilo: 1 \times DreamTaq pufera (Thermo Scientific™), 0.4 μ M svakog prajmera, 0.2 mM dNTPs, 1 jedinica DreamTaq DNK polimeraze (Thermo Scientific™) i 2 μ l izolovane DNK. Temperaturni profil PCR reakcije se sastojao od 10 minuta inicijalne denaturacije na 95°C, 10 ciklusa koji su se sastojali od 15 s na 95°C, 30 s na 65°C (svaka dva ciklusa je temperatura smanjivana za 2°C, od 65°C do 57°C) i 1 min na 72°C. Nakon toga je sledilo 30 ciklusa koji su se sastojali od 15 s na 95°C, 30 s na 55 °C i 1 min na 72°C, uz finalnu elongaciju na 72°C u trajanju od 10 minuta. Kvalitet umnoženih fragmenata je proveren pomoću elektroforeze na 1.2% agaroznom gelu, nakon čega su amplifikovani produkti poslani u Macrogen Inc. (Holandija) na sekvenciranje u oba smera. Sirove sekvence su pregledane pomoću softvera Chromas 2.5.1 (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>; Technelysium Pty Ltd. Australia) i sa krajeva su „odsečeni“ delovi koji su bili lošeg kvaliteta. Sređene sekvence su složene i poravnate upotrebom ClustalW algoritma (Thompson i sar. 1994) u softveru Mega6 (Tamura i sar. 2013), nakon čega su dodatno vizualno pregledane i proverene.

Tabela 1. Spisak lokaliteta sa brojem jedinki (veličina uzorka) koje su korišćene za analizu sekvenci mitohondrijske D-petlje kod *Rhinolophus euryale*

Lokalitet	Geografski region	Veličina uzorka
Canetova pećina	Istočna Srbija	4
Bela Sala	Istočna Srbija	5
Pećurski kamen	Istočna Srbija	5
Ljubinkova pećina	Istočna Srbija	5
Lazareva pećina	Istočna Srbija	5
Toplik	Istočna Srbija	1
Tomina pećina	Istočna Srbija	1
Temska	Istočna Srbija	5
Držina	Istočna Srbija	5
Ćebića pećina	Zapadna Srbija	5
Drenajićka pećina	Zapadna Srbija	5
Petnička pećina	Zapadna Srbija	5
Tmuša	Zapadna Srbija	5
Dardagani	Istočna BiH	3
Rastuša	Severna BiH	5
Začirska pećina	Crna Gora	5
Kostanjeviša jama	Istočna Slovenija	5
Planina Lure	Albanija	2
Elenina dupka	Istočna Bugarska	1
Dolina Titerna	Južna Italija	5



Slika 4. Mapa lokaliteta sa kojih su prikupljeni uzorci za analizu mitohondrijske DNK. Imena lokaliteta i veličina uzorka su dati u Tabeli 1.

3.5.2. Analiza podataka

Definisanje haplotipova na osnovu dobijenih sekvenci urađeno je pomoću softvera DnaSP v6 (Rozas i sar. 2017). Isti program je korišćen za računanje diverziteta haplotipova (h), nukleotidnog diverziteta (π) i broja polimorfnih mesta.

Za filogenetske analize su ovim sekvencama dodate postojeće sekvence *R. euryale* (ukupno 47) za ovaj fragment D-petlje koje su dostupne u *GenBank*-u (pristupni brojevi: AY923062, DQ417500-DQ417507, DQ417509-DQ417510, DQ417512-DQ417514, DQ417516-DQ417519, DQ445458-DQ445459, KU531305, KF031267-KF031268 i MH223409-MH223432). Sekvence dve vrste srednjih potkovičara *Rhinolophus mehelyi* (pristupni brojevi: KF031265-KF031266, KU531357-KU531358, MH223434) i *Rhinolophus blasii* (pristupni brojevi: KU531263-KU531269) su korišćene kao outgrupe. Finalni set podataka za filogenetske i filogeografske analize se sastojao od 141 sekvence D-petlje, od čega je 129 sekvenci pripadalo *Rhinolophus euryale*, pet *R. mehelyi* i sedam *R. blasii*. Za ove analize su sve sekvence skraćene na 404 bp da bi bile jednake dužine.

Bajesovska inferencija u softveru BEAST v2.4.3 (Bouckaert i sar. 2014) je korišćena za rekonstrukciju filogenetskih odnosa unutar ove vrste, kao i filogenetskih odnosa ove vrste sa *outgrupama*. Pomoću programa jModelTest v2.1.10 (Darriba i sar. 2012) je na osnovu bajesovog informacionog kriterijuma (engl. *Bayesian Information Criterion* – *BIC*) izračunato koji model supstitucije najbolje opisuje sekvence u ovom setu podataka, i odabran je HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) model supstitucije. U podešavanjima za bajesovske analize je korišćen model striktnog sata, za konstantnu veličinu populacije. Izvršene su dve nezavisne analize sa identičnim podešavanjima u trajanju od 10000000 iteracija, pri čemu je uzorkovanje vršeno na svakih 10000 iteracija. Konvergencija lanaca i efektivne veličine uzoraka su bili provereni u softveru Tracer v1.7.1 (Rambaut i sar. 2018). Rezultati ove dve analize su bili kombinovani pomoću programa LogCombiner v1.8.2 (<https://github.com/CompEvol/beast2/releases/tag/v2.4.3>), i konsenzus filogenetsko stablo je konstruisano u programu TreeAnnotator v2.4.3 (<https://github.com/CompEvol/beast2/releases/tag/v2.4.3>) koristeći topologiju maksimalnog kredibiliteta klada. Čvorišta su konstruisana na osnovu vrednosti medijana, a granična vrednost posteriorne verovatnoće je postavljena na 0.5. Prvih 20% stabala je bilo odbačeno kao *burn-in*, a finalno stablo je vizualizovano u FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Genetičke distance između i unutar dobro podržanih klada su bile izračunate koristeći Kimura 2-parametarski model (Kimura 1980) u softveru Mega6 (Tamura i sar. 2013). Za konstruisanje mreže haplotipova je korišćena *median-joining* (M-J) metoda (Bandelt i sar. 1999) u softveru NETWORK 5.0.0.3 (Fluxus Technology, <http://www.fluxus-engineering.com>).

U cilju testiranja da li je došlo do nagle ekspanzije populacija sredozemnog potkovičara u prošlosti, urađena je analiza *mismatch* distribucije u softveru DnaSP v6 (Rozas i sar. 2017). Populacije koje su u prošlosti pretrpele naglu ekspanziju obično pokazuju unimodalnu distribuciju međusobnih razlika, dok populacije kod kojih je bilo nekoliko kolonizacionih događaja pokazuju multimodalnu *mismatch* distribuciju (Rogers i Harpending 1992). Značajnost poklapanja uočene i dobijene *mismatch* distribucije je bila testirana pomoću Harpending-ovog indeksa r (Rogers i Harpending 1992). Dodatno, u istom softveru su urađeni i Fu-ov F_s (Fu 1997) i Tajima D (Tajima 1989) test. Statistički značajne negativne vrednosti ova dva testa su pokazatelji da su populacije u prošlosti

prošle kroz fazu ekspanzije (Tajima 1989; Fu 1997). Značajnost rezultata ova dva testa je proverena u softveru DnaSP v6 (Rozas i sar. 2017) koristeći 10000 koalescentnih simulacija. U slučaju gde je bila detektovana ekspanzija, izračunato je vreme ekspanzije na osnovu $\tau=2ut$ (Rogers i Harpending 1992) gde je u proizvod stope mutacije i dužine analizirane sekvence. Korišćena je stopa supstitucije od 20% na milion godina, kako je predloženo za D-petlju (Petit i sar. 1999), i vreme generacije od 2 godine kao za kongeneričke vrste *R. ferrumequinum* i *R. hipposideros* (Flanders i sar. 2009; Dool i sar. 2013). Prilikom računanja vremena kada je došlo do populacione ekspanzije uzete su u obzir veličine populacija u prethodno publikovanim studijama, pošto rezultati ovih analiza zavise od veličine uzorka odnosno frekvencije haplotipova.

3.6. MIKROSATELITI

3.6.1. Uzorak i laboratorijske procedure

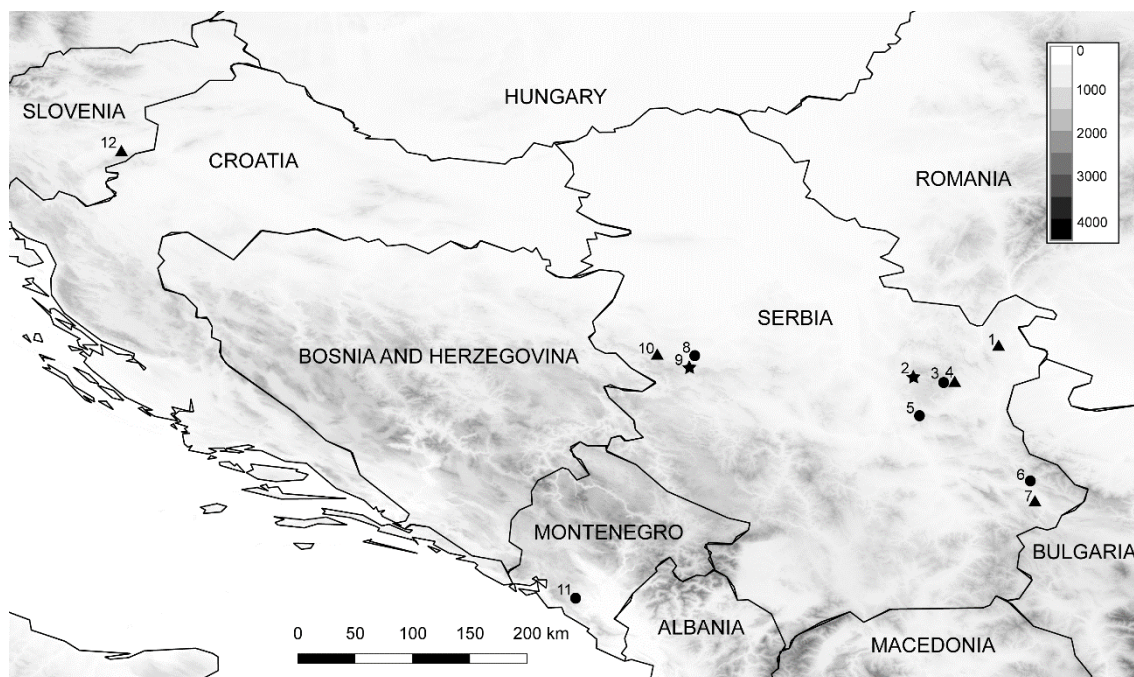
254 jedinke sa 10 lokaliteta u Srbiji, i po jednog lokaliteta iz Crne Gore i Slovenije (Tabela 2, Slika 5) su bile genotipizirane pomoću mikrosatelitskih markera. Iz seta mikrosatelitskih lokusa identifikovanih kod *Rhinolophus euryale* i sestrinske vrste *R. mehelyi*, odabrano je osam lokusa koji su bili umnoženi: RE007, RE017, RM002, RM003, RM010, RM011, RM015 i RM025 (Puechmaille i sar. 2014). Sekvence i koncentracije prajmera kao i dužine analiziranih lokusa su dati u Tabeli 3. Šest lokusa (svi osim RM002 i RM010) su umnoženi u jedinstvenoj multipleks PCR reakciji u ukupnoj zapremini od 10 μ l koja je sadržala 1 μ l izolovane DNK, 1 x Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN) i prajmere u koncentracijama datim u Tabeli 3, a prema protokolu (Puechmaille i sar. 2014). Temperaturni uslovi su bili sledeći: inicijalna denaturacija u trajanju od 15 minuta na 95°C, 45 ciklusa koji su se sastojali od 45 s na 94°C, 45 s na 56°C i 1 min. na 72°C, uz finalnu ekstenziju u trajanju od 1 sata na 72°C (Puechmaille i sar. 2005). Preostala dva mikrosatelitska lokusa (RM002 i RM010) su umnožena u odvojenoj PCR reakciji u zapremini od 10 μ l koja je sadržala 1 μ l genomske DNK, 1 x GoTaq pufera (Promega), 1.5 mM Mg²⁺, prajmere RM002 i RM010 u koncentracijama datim u Tabeli 3, 0.5 mM dNTPs i 0.5 jedinice GoTaq DNK polimeraze (Promega). Temperaturni uslovi za umnožavanje mikrosatelita pomoću ovih prajmera su bili sledeći:

inicijalna denturacija na 95°C u trajanju od 3 minuta, 40 ciklusa koji su se sastojali od 30 s na 95°C, 30 s na 60°C i 30 s na 72°C i finalne elongacije na 72°C u trajanju od 10 minuta. PCR produkti su čuvani na 4°C do genotipizacije. Genotipizacija je vršena na četvorokapilarnom sekvenatoru ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems) uz upotrebu 500-LIZ standarda (Applied Biosystems) za dužinu fragmenata. Genotipovi su vizualizovani i očitani pomoću softvera GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems). Dobijeni rezultati su deponovani na Figshare (DOI <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.7093646>).

Tabela 2. Spisak uzorkovanih lokaliteta u okviru geografskih regiona, veličina uzorka i tip uzorkovanih kolonija.

Redni broj	Lokalitet	Region	Broj jedinki	Tip kolonije
1	Canetova pećina	IS	19	Hibernacijska
2	Bela Sala	IS	21	Muška letnja
3	Ljubinkova pećina	IS	35	Porodiljska
4	Lazareva pećina	IS	24	Hibernacijska
5	Pećurski kamen	IS	18	Porodiljska
6	Temska	IS	24	Porodiljska
7	Držinska pećina	IS	40	Hibernacijska/prelazna
8	Petnička pećina	ZS	23	Porodiljska
9	Tmuša	ZS	15	Muška letnja
10	Drenajićka pećina	ZS	10	Hibernacijska/prelazna
11	Začirska pećina	CG	12	Hibernacijska/prelazna
12	Kostanjeviška jama	SLO	13	Hibernacijska

IS – istočna Srbija; ZS – zapadna Srbija; CG – Crna Gora; SLO – Slovenija.



Slika 5. Mapa uzorkovanih populacija. Brojevi odgovaraju brojevima lokaliteta iz Tabele 1. Trougao – hibernacijsko sklonište; zvezda – muška letnja kolonija; krug – porodijska kolonija.

Tabela 3. Sekvence i koncentracije mikrosatelitskih prajmera (Puechmaille i sar. 2014)

Lokus	Ponovak	Sekvenca prajmera	Koncentracija [μ M]
RE007	(TCTA) ₁₂	F: VIC-GTGTTCAGTGCTGCTATCCC R: GTTTCTTATCGTGATCCATGCAAGC	0.07
RE017	(GT) ₂₄	F: PET-CTGGACATCCTTTGCTTTTCG R: GTTTCTTCACACAGCAATGGAAACAGG	0.18
RM002	(TTTC) ₁₈	F: VIC-AAAAGCTGTGCTCAAAGTGC R: TCAAATCATGTTGCCTACAAGC	0.18
RM003	(AAGG) ₁₆	F: PET-CAGAGTGGACCCTCAGTTCC R: GTTTCTTACCTTGGCTCTAGAATGCC	0.16
RM010	(TAGA) ₁₃	F: NED-AATGTGTTGTCAGCCAGGG R: TTTCTTACCTAGTATGTTGCCATCTGTGG	0.50
RM011	(TCTA) ₁₃	F: FAM-GATAGGCATGGAACATTGGG R: TGTGCCTTAATATCTCATCGACC	0.24
RM015	(ATGG) ₁₂	F: VIC-TTCAATCTGTTGAATGAGTGCC R: CGACCCATCCACTTACTAATCC	0.07
RM025	(GT) ₂₁	F: PET-AGCCCTGGGTTTCATCAGC R: TTTCTTAGTGTTAGTACACATCTCCCTCCC	0.12

3.6.2. Analiza podataka

U cilju analiziranja ukupne strukturiranosti populacija (odnosno utvrđivanja ukupnog broja genetičkih klastera koji postoje u celom uzorku) korišćen je Bajesov metod grupisanja (engl. *Bayesian clustering method*) u softveru STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard i sar. 2000). Analiza je rađena pod pretpostavkom da analizirane jedinke imaju zajedničko poreklo (engl. *admixture model*) i korelisane frekvencije alela (engl. *correlated allele frequencies*), uz *a priori* informacije o tome iz kojih populacija potiču analizirane jedinke. U cilju određivanja optimalnog broja klastera (K), testiran je broj klastera od 1–12. Za svaku vrednost K je urađeno 10 nezavisnih simulacija koje su se sastojale od 1000000 MCMC (eng. *Markov Chain Monte Carlo*) ponavljanja, od kojih je prvih 100000 ponavljanja bilo odbačeno kao *burn-in*. Verovatnoća za svaku vrednost K je bila utvrđena koristeći ΔK metod prema Evanno i sar. (2005) koji je implementiran u programu STRUCTURE HARVESTER 0.6.94 (Earl i vonHoldt 2012). S obzirom na neujednačen uzorak (različiti broj jedinki iz različitih populacija), prateći preporuke Puechmaille (2016), pre ovih analiza je iz postojećeg uzorka urađeno ponovno uzorkovanje. Naime, petnaest individua je nasumično odabrano sa svakog lokaliteta, a na lokalitetima gde je veličina uzorka bila ≤ 15 su analizirane sve jedinke. Takođe, u cilju što preciznijeg određivanja broja postojećih klastera, izračunati su dodatni parametri MaxMeaK i MaxMedK (Puechmaille 2016) koristeći 0.5 kao graničnu vrednost za srednju vrednost koeficijenta pripadnosti populaciji.

Genetička strukturiranost populacija je bila analizirana i u R programskom paketu GENELAND 4.0.7. (Guillot i sar. 2005). Ovaj programski paket za određivanje broja genetičkih klastera u analiziranom uzorku koristi informaciju o geografskom poreklu (geografske koordinate) individualnih uzoraka. Izvršeno je deset nezavisnih simultanih MCMC analiza koje su se sastojale od 1000000 iteracija od kojih je svaka 10000-ta izbacivana, i naknadno je 10% odbačeno kao *burn-in*. Broj potencijalnih klastera (K) je bio testiran za vrednosti 1–12, uz pretpostavku tačnih prostornih (engl. *spatial model*) i nultih modela (engl. *null model*). Optimalan broj klastera K je odabran na osnovu najveće vrednosti srednje posteriorne gustine među analizama.

Softveri GenAEx 6.503 (Peakall i Smouse 2012) i FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995) su korišćeni za izračunavanje parametara genskog diverziteta. Za svaku populaciju su izračunati broj alela po lokusu (N_A), bogatstvo alela (R), uočena (H_O) i očekivana (H_E) heterozigotnost i koeficijent inbridinga (F_{IS}). Odstupanja od Hardy–Vajnbergove ravnoteže (engl. *Hardy-Weinberg Equilibrium* - *HWE*) su testirana u programu GENEPOP 4.6.9 (Raymond i Rousset 1995). Program Micro-checker 2.2.3 (Van Oosterhout i sar. 2004) je korišćen za proveru grešaka i prisustva nultih alela, a globalne vrednosti između parova populacija koje su korigovane za prisustvo nultih alela su bile izračunate koristeći program FreeNA (Chapuis i Estoup 2007). Genetička diferenciranost između kolonija je bila kvantifikovana izračunavanjem F_{ST} vrednosti između parova kolonija (Weir i Cockerham 1984) u softveru Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier i Lischer 2010), pri čemu je svaka kolonija bila tretirana kao zasebna populacija. U slučaju visoko polimorfni lokusa, maksimalna vrednost F_{ST} ne može dostići vrednost 1 (Jost 2008). Da bi se dobila preciznija procena substrukturiranosti populacija, pored F_{ST} su dodatno izračunati Jost D (Jost 2008) i G''_{ST} (Meirmans i Hedrick 2011) parametri između parova populacija u programu GenAEx 6.503 (Peakall i Smouse 2012) bazirano na 999 permutacija. Isti program je korišćen i za izračunavanje Jost D i G''_{ST} između parova klastera koji su dobijeni u STRUCTURE analizi. Testiranje genetičke diferenciranosti između genetičkih klastera koji su dobijeni u programu STRUCTURE je izvršeno analizom molekularne varijanse (AMOVA) u programu Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier i Lischer 2010).

Mantel test u softveru Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier i Lischer 2010) je korišćen za poređenje matrica geografskih i genetičkih distanci sa ciljem testiranja izolacije putem distance. Kao geografske distance su korišćene Euklidove distance između lokaliteta, dok su genetičke distance bile izračunate kao $F_{ST}/(1-F_{ST})$. Ista matrica geografskih distanci između lokaliteta je korišćena za dodatne Mantel testove koji su urađeni u programu ZT 1.1 (Bonnet i Van de Peer 2002) sa 10000 randomizovanih permutacija, a kao matrice genetičkih distanci su korišćene Jost D i G''_{ST} vrednosti između parova populacija. Dodatno, da bi se analizirao združeni efekat geografskih i sredinskih faktora na genetičku diferenciranost, urađen je parcijalni Mantel test baziran na Pirsonovom *product-moment* koeficijentu korelacije u R programskom paketu VEGAN 2.5–2 R (Oksanen i sar. 2017). G''_{ST} vrednosti su korišćene kao genetičke distance, a Euklidove distance između

lokaliteta kao geografske. U cilju kvantifikovanja sredinskih razlika između lokaliteta, 19 bioklimatskih varijabli za trenutne uslove je preuzeto, za svaki lokalitet, iz WorldClim2 baze (Fick i Hijmans 2017), sa rezolucijom od $\sim 1 \text{ km}^2$ (30 sekundi). Ove varijable su sumirane pomoću analize glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis* – *PCA*). Prva komponenta (PC1) je opisivala 54.81% ukupne varijabilnosti sredinskih faktora, i ona je korišćena za dalje analize. Izračunate su Euklidove distance između lokaliteta, i ta matrica je korišćena kao treća u parcijalnom Mantelovom testu.

Razlika u disperziji između polova je bila analizirana upotrebom *sexbias* funkcije u HIERFSTAT R programskom paketu (Goudet 2005). Srednja vrednost korigovanog indeksa pripadnosti (mAIc), varijansa korigovanog indeksa pripadnosti (vAIc), vrednosti F_{IS} i F_{ST} su bile poređene između polova pomoću dvostranog t-testa, a statistička značajnost je procenjena na osnovu 10000 permutacija.

Recentne stope mutacije između populacija koje pripadaju različitim geografskim regijama (istočna Srbija, zapadna Srbija, Crna Gora i Slovenija) su bile procenjene koristeći Bajesov pristup u programu BayesAss 3.0.3 (Wilson i Rannala 2003). Analiza se sastojala od 6000000 MCMC iteracija koje su predstavljale *burn-in* i 30000000 MCMC iteracija od kojih je svaka 1000-ta uzorkovana. Za simulacije su korišćeni sledeći parametri mešanja: parametar za stopu migracije (m), za frekvencije alela (a) i za koeficijent inbridinga (f). Njihove vrednosti su varirane u cilju dobijanja preporučenih vrednosti stopa prihvatanja, i finalne simulacije su rađene sa sledećim vrednostima tih parametara: $m = 0.2$, $a = 0.5$, $f = 0.6$ u cilju dobijanja preporučenih vrednosti. Mešanje i konvergencija MCMC lanaca su bili provereni vizualizacijom u programu Tracer 1.7 (Rambaut i sar. 2018).

Stepen srodstva između jedinki u okviru kolonija, kao i između jedinki iz različitih kolonija je bio izračunat pomoću pokazatelja (engl. *estimator*) srodnosti između parova prema Queller i Goodnight (1989), dobijenim u softveru Coancestry 1.0.1.8 (Wang 2011). Testiranje da li postoje značajne razlike u stepenu srodnosti između jedinki u kolonijama različitog tipa (porodiljske, muške letnje, hibernacijske) je bilo izvršeno pomoću analize varijanse (ANOVA) u programu Statistica 5.1 (StatSoft 1997).

4. REZULTATI

4.1. DISTRIBUCIJA *R. euryale* U SRBIJI

U periodu 2012-2017 sredozemni potkovičar je pronađen na 26 lokaliteta u Srbiji (Slika 6), od kojih je na 11 lokaliteta prisustvo ove vrste zabeleženo prvi put. Neki od ovih novih nalaza ove vrste za Srbiju su u međuvremenu objavljeni (Budinski 2013; Budinski i sar. 2016; Paunović i sar. 2018). Takođe je pronađeno i novo hibernacijsko sklonište *R. euryale* na teritoriji Bosne i Hercegovine u napuštenom rimskom kamenolomu u Dardaganima blizu Zvornika (Presetnik i sar. 2016).

U zapadnoj i jugozapadnoj Srbiji je ova vrsta po prvi put zabeležena na tri lokaliteta: Ćebića pećina blizu Valjeva, okolina planinarskog doma „Kablar“ u Ovčarsko-Kablarskoj klisuri i pećina na Ćetanici iznad kanjona reke Mileševke. Preostalih osam nalaza zabeleženo je u istočnoj i jugoistočnoj Srbiji: Tomina pećina na Rgotskom kamenu, pećina Mala Bizdanja na Samanjcu, Ranjena pećina blizu sela Vratarnica, ponor Pandiralo, okolina sela Krupac blizu Bele Palanke, napuštena farma blizu sela Temska, pećina iznad sela Rsovci i pećina Vetrena Dupka blizu sela Vlasi. Nalazi na lokalitetima Kablar, Krupac i Ćetanica su zabeleženi na osnovu snimljenih eholokacionih signala, dok su na ostalim lokalitetima životinje bile uhvaćene i/ili slikane, na osnovu čega je utvrđen identitet vrste. Na tim lokalitetima je takođe bilo moguće proceniti brojnost, osim u slučaju pećine iznad sela Rsovci. U julu 2010. godine je ornitolog Ivan Medenica napravio fotografije kolonije srednjih potkovičara u toj pećini, ali pošto su životinje letele nije bilo moguće proceniti brojnost.

Zahvaljujući speleolozima, pronađene su tri nove hibernacijske kolonije sredozemnog potkovičara. Speleolog Zoran Simić je u decembru 2015. godine fotografisao hibernirajuću koloniju srednjih potkovičara koja je brojala preko 1000 jedinki u Maloj Bizdanji na Samanjcu, a Heliana Dundarova iz Bugarske je u januaru 2016. godine zabeležila oko 300 jedinki na hibernaciji u pećini Vetrena Dupka blizu sela Vlasi. U kasnu jesen 2016. je u Ranjenoj pećini blizu sela Vratarnica zabeležena velika hibernacijska kolonija koja je brojala oko 3000 srednjih potkovičara, od kojih je najbrojnija vrsta bio *R. euryale* (Paunović i sar. 2018).



Slika 6. Nalazi *R. euryale* u Srbiji. Žuti krug – nalazi koji su ranije publikovani; plava zvezda – ranije publikovani nalazi koji su potvrđeni prilikom obilaska ovih lokaliteta u periodu 2012-2017; crveni romb – prvi put zabeleženi nalazi ove vrste.

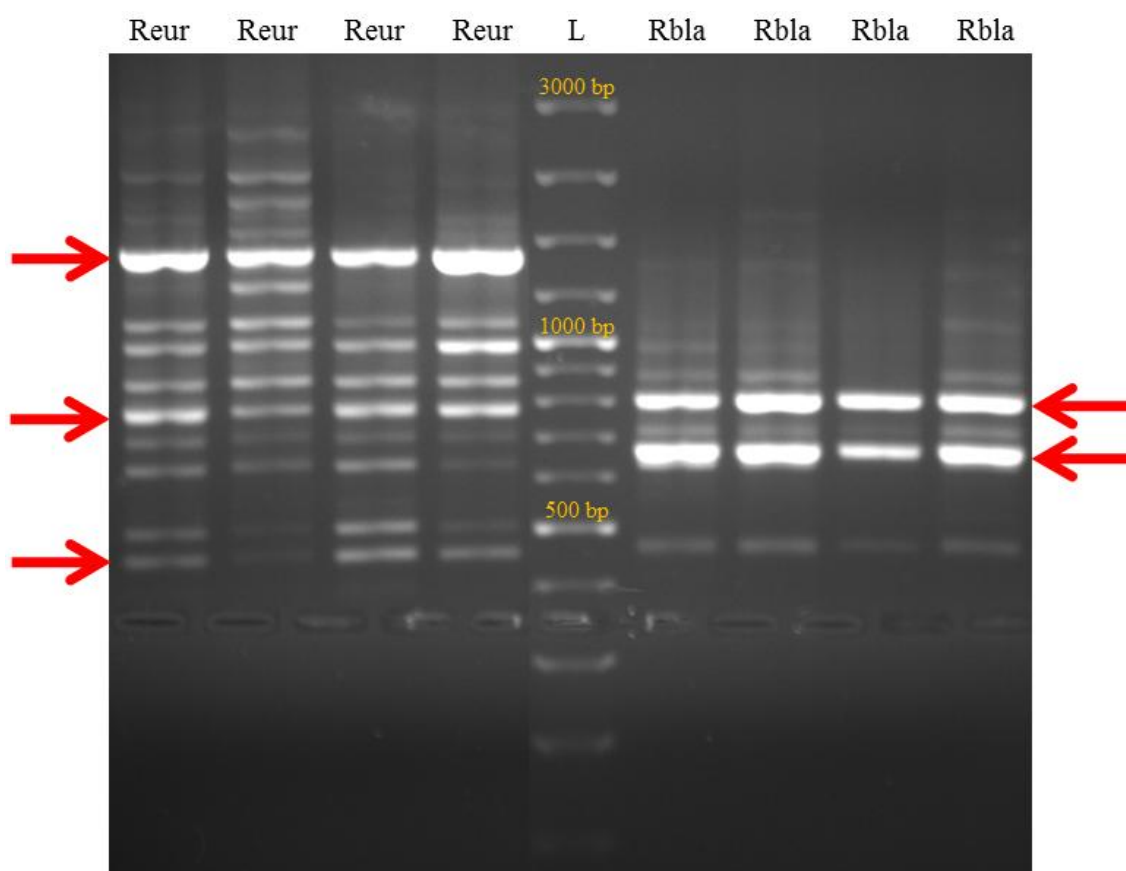
Pronađena je nova porodiljska kolonija ove vrste u Srbiji blizu sela Temska (okolina Pirota), koju ova vrsta čini sa vrstama *R. ferrumequinum* i *Myotis emarginatus*, i koja predstavlja jedino poznato sklonište ove vrste u Srbiji koje je u građevini. Takođe je indirektno zabeleženo potencijalno prisustvo još dve nove porodiljske kolonije u Srbiji, u Tominoj i Ogoreličkoj pećini.

Osim novih nalaza ove vrste, *R. euryale* je bio nalažen na lokalitetima koji su bili poznati od ranije. Najznačajnije porodiljske kolonije ove vrste u Srbiji su Petnička pećina blizu Valjeva, i porodiljske kolonije u pećini Pećurski kamen i Ljubinkovoj pećini u istočnoj Srbiji, dok su najznačajnija od ranije poznata hibernacijska skloništa u Canetovoj i Lazarevoj pećini u istočnoj Srbiji. Ove kolonije su bile stabilne za vreme perioda istraživanja, i ni na jednom od lokaliteta nije bio zabeležen značajniji pad brojnosti. U pećini Tmuša u zapadnoj Srbiji je pronađena nova letnja kolonija mužjaka sredozemnog potkovičara. Prvi put je kolonija mužjaka na tom lokalitetu zabeležena u julu 2013. godine, nakon čega je ova pećina bila posećena još nekoliko puta u letnjem periodu, i svaki put su svi uhvaćeni primerci ove vrste bili isključivo mužjaci. Veličina kolonije je u tom periodu brojala između 100 i 300 jedinki sredozemnog potkovičara.

Tokom terenskih istraživanja uhvaćeno je ukupno 413 jedinki sredozemnog potkovičara na 15 lokaliteta u Srbiji, i po jednom lokalitetu u Crnoj Gori (Začirska pećina) i Bosni i Hercegovini (rimski kamenolom u Dardaganima) (Prilog 2). Prstenovane su 404 jedinke krilnim markerima Centra za markiranje životinja pri Prirodnjačkom muzeju u Beogradu, i u tom periodu je zabeležen jedan kontrolni nalaz. Odrasli mužjak koji je markiran 16.10.2012. u Lazarevoj pećini je uhvaćen 8.3.2013. na istom lokalitetu. Ukupno je prikupljeno 384 uzorka tkiva za genetičke analize od ove vrste, od kojih je iz 280 izolovana DNK.

4.2. GENETIČKE ANALIZE ISSR-PCR

Upotrebom ISSR prajmera je dobijen veliki broj fragmenata različite dužine, od kojih se nekoliko traka izdvojilo kao specijes-specifične (bile su konzistentne u okviru vrsta na svim analiziranim lokalitetima) koje su omogućile razlikovanje sredozemnog (*R. euryale*) i južnog potkovičara (*R. blasii*). Kod *R. euryale* specifične trake su dužine od oko 460 bp, 790 bp i oko 1400 bp, dok su za *R. blasii* specifične trake dužine oko 680 bp i 810 bp (Slika 7).

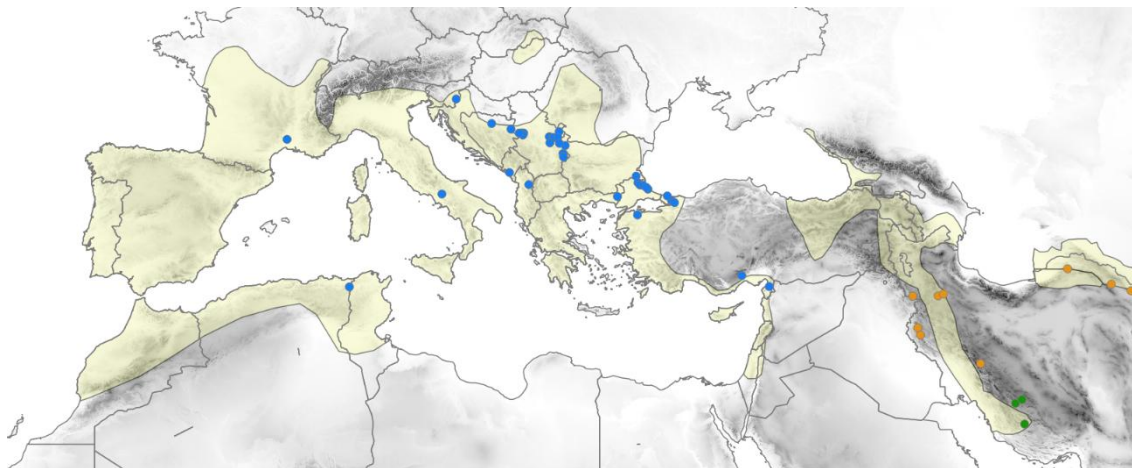


Slika 7. Elektroforetski profili vrsta *R. euryale* (Reur) i *R. blasii* (Rbla). Trake specifične za vrste su obeležene crvenim strelicama. L – GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus.

4.3. GENETIČKE ANALIZE MITOHONDRIJSKE DNK

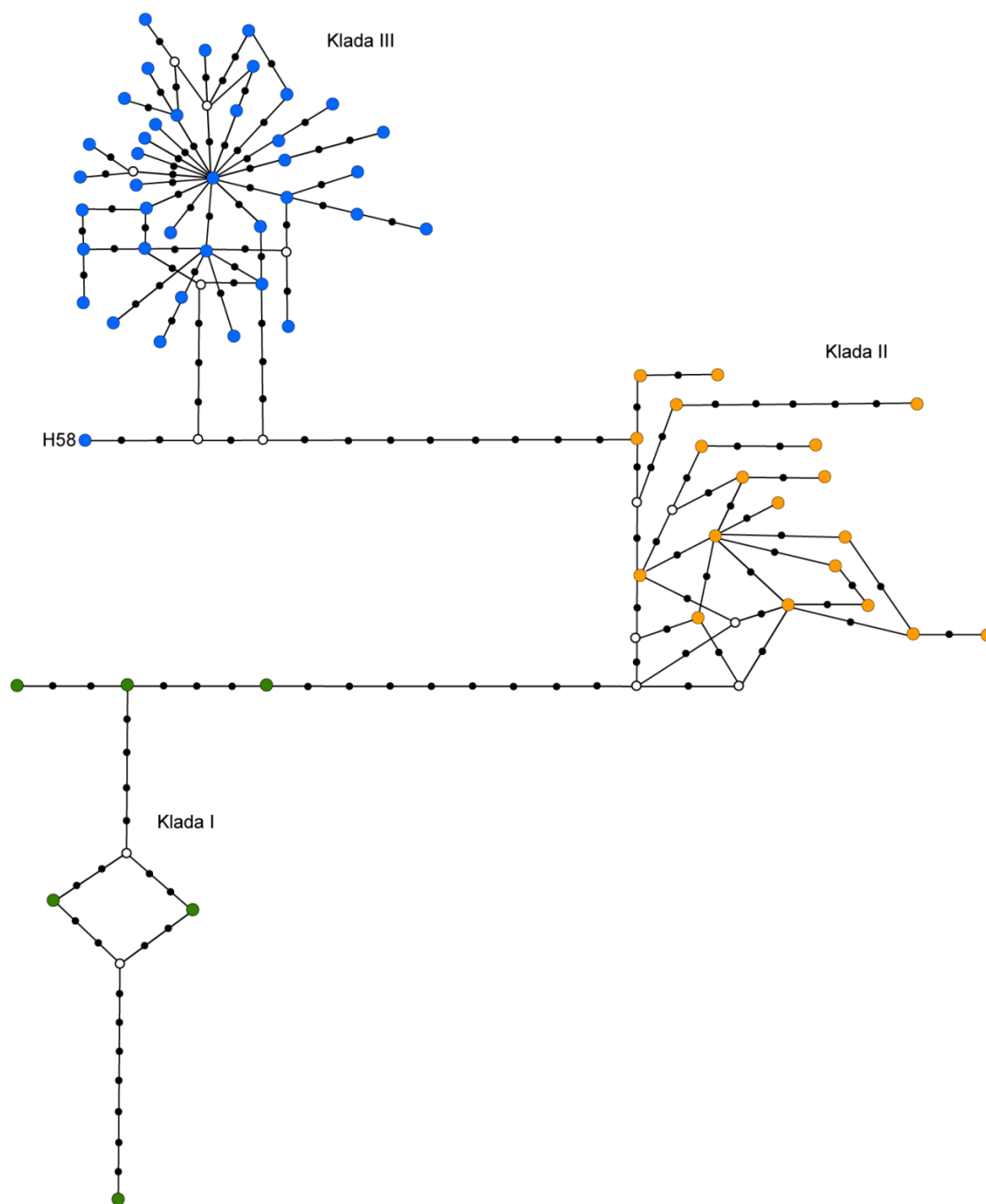
Na osnovu razlika u sekvenci D-petlje u dužini od 711 bp, ukupno su identifikovana 24 različita haplotipa na analiziranom uzorku (Budinski i sar. 2019b). Dobijene sekvence su pohranjene u GenBank gde su im dodeljeni pristupni brojevi MK977742-MK977824. Na analiziranom fragmentu su zabeležena 23 polimorfna mesta, od kojih je 12 bilo parsimonijski informativno. Diverzitet haplotipova h (\pm SD) je 0.871 (\pm 0.028), a nukleotidni π (\pm SD) je 0.00292 (\pm 0.00025). Nakon skraćivanja sekvenci na dužinu od 404 bp (deo sekvence koji je uklonjen nije bio varijabilan), 20 haplotipova je zabeleženo prvi put, dok su 4 haplotipa ranije detektovana (Bilgin i sar. 2008).

U analizama filogenetske rekonstrukcije zasnovane na Bajesovom pristupu su se izdvojile tri glavne monofiletske klade (Slika 8). Klade I i II obuhvataju uzorke iz Irana, i u njima je raspoređeno svih 25 haplotipova koje su našli Najafi i sar. (2018). Ove dve klade odgovaraju različitim geografskim regionima u Iranu (Slika 9). Uzorci iz klade I potiču sa područja Južnog Irana (odgovaraju subkladi B u publikaciji Najafi i sar. 2018), dok su se uzorci iz ostalih delova Irana grupisali u kladu II (odgovaraju subkladi A u publikaciji Najafi i sar. 2018). U kladi III su se grupisali svi uzorci analizirani u ovoj tezi zajedno sa prethodno analiziranim uzorcima iz Evrope, Turske i Severne Afrike. Stepenn divergencije između uzoraka iz Irana i klade III je 4.2% (4.8% između klade I i klade III, odnosno 4.3% između klade II i klade III). Dve iranske klade su se grupisale zajedno, međutim, zbog niske posteriorne verovatnoće (0.37), postoji mogućnost da je prvo došlo do odvajanja klade I, pa klade II a tek onda se od njih odvojila klada III. Filogenetski odnos između iranskih klada, kao i njihov odnos sa kladom III nije još uvek u potpunosti razjašnjen. Dobijena genetička varijabilnost unutar klada I, II i III je redom: 2.1% (raspon 0.5-4.1%), 0.7% (raspon 0-1.5%) i 0.6% (0-2.8%). U okviru klade III se jedan uzorak iz Turske (haplotip H58) jasno razlikuje od ostalih. Ovaj uzorak (pristupni broj DQ417510) potiče sa lokaliteta Hatay na području istočnog Mediterana (Bilgin i sar. 2008). Svi ostali uzorci grupisali su se u jednu visoko podržanu granu (Slika 8). Stepenn divergencije između haplotipa H58 i ostalih haplotipova u okviru klade III iznosi 2.1% (1.5-2.8%), i procenjeno vreme kada je došlo do razdvajanja tih grupa je pre oko 79000 godina (95% HPD 43500-116000 godina).

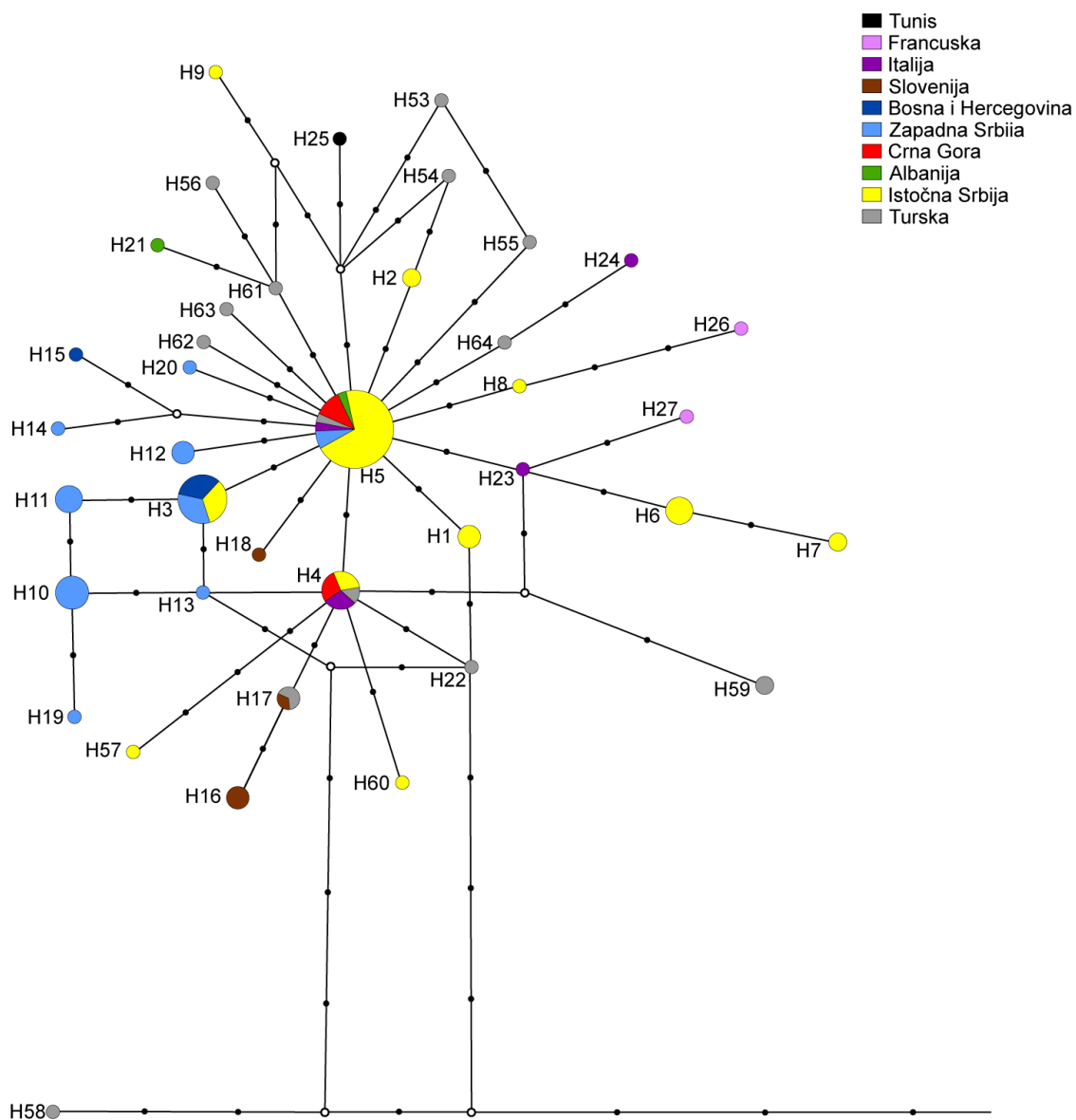


Slika 9. Mapa svih lokaliteta sa kojih su uzorci bili uključeni u analizu mitohondrijske DNK. Boje lokaliteta odgovaraju filogenetskim kladama prikazanim na Slici 8. Žutom bojom je prikazana distribucija *R. euryale* prema IUCN-u (Juste i Alcalde 2016).

Prilikom konstruisanja mreže haplotipova su se izdvojile iste tri grupe. Na M-J mreži haplotipova (Slika 10) se vide tri jasno odvojene mtDNK pod-mreže, koje odgovaraju glavnim linijama koje su dobijene u Bajesovim filogenetskim analizama (Slika 8). Dve pod-mreže sadrže uzorke iz Irana (a odgovaraju kladama I i II), dok treća sadrži haplotipove koji odgovaraju kladi III (uzorci iz Evrope, Turske i Severne Afrike). U mreži haplotipova se takođe vidi izdvajanje haplotipa H58 u okviru klade III. Pod-mrežu koja predstavlja evropsku subkladu karakteriše zvezdasta struktura, koja je najčešće indikator populacione ekspanzije u demografskoj istoriji vrste. Najzastupljeniji haplotip je H5, i on zauzima centralnu poziciju u mreži, a oko njega su raspoređeni ostali haplotipovi koji imaju malu frekvenciju, i u većini slučajeva se razlikuju od centralnog haplotipa u jednoj ili svega nekoliko mutacija. Većina haplotipova je karakteristična za određene geografske regione, npr. haplotipovi H1-H2, H6-H8 su prisutni samo u istočnoj Srbiji, a haplotipovi H10-H14 i H19-H20 samo u zapadnoj (Slika 11).



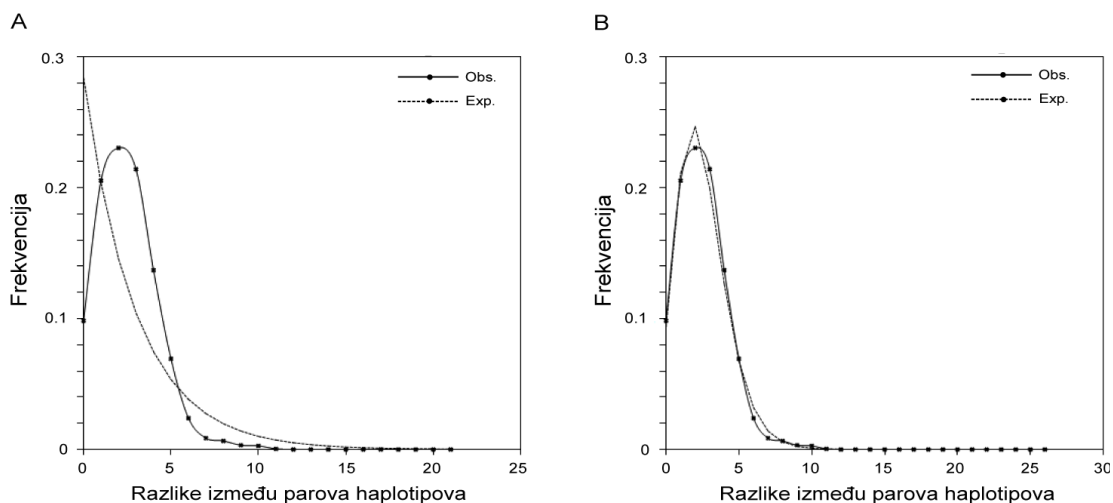
Slika 10. *Median-joining* (M-J) mreža haplotipova (veličina krugova nije proporcionalna frekvenciji haplotipova). Crne tačke predstavljaju mutacije, a belim krugovima su predstavljeni „*median vectors*“. Boje haplotipova odgovaraju kladama dobijenim u Bajesovoj filogenetskoj analizi koje su prikazane na Slici 8.



Slika 11. Median-joining mreža haplotipova *R. euryale* u okviru Klade III. Veličina krugova je proporcionalna frekvenciji haplotipova. Crne tačke predstavljaju mutacije, a beli krugovi „median vectors“. Boje odgovaraju različitim geografskim regijama datim u legendi.

Analiza *mismatch* distribucije klade III je pokazala unimodalnu distribuciju, i dobijeni rezultati ukazuju na to da demografska istorija ove grupe više odgovara modelu demografske ekspanzije (Slika 12B) nego modelu konstantne veličine populacije (Slika 12A). Vrednost Harpending-ovog indeksa iznosi $r = 0.0252$, a p vrednost nije statistički

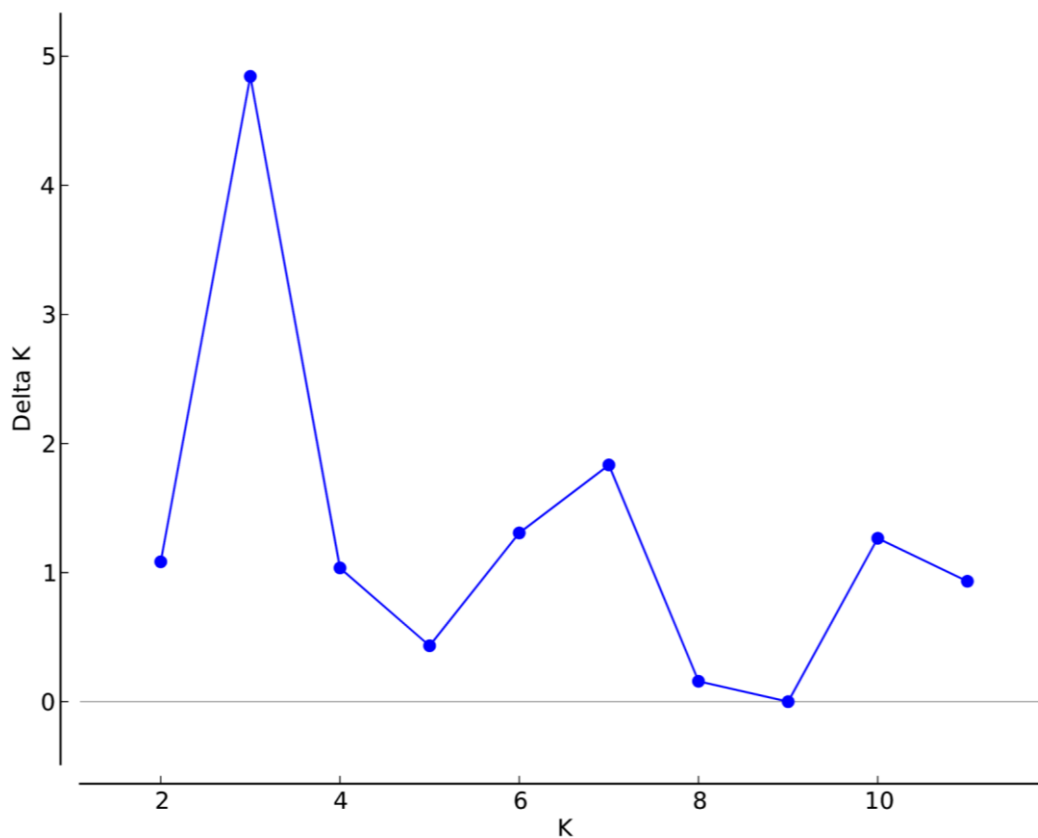
značajna ni za dobijene ni za simulirane podatke ($p = 0.091$). Scenario populacione ekspanzije u okviru evropske podklade je dodatno podržan rezultatima Fu-ovog Fs ($F_s = -38.346$, $p < 0.001$) i Tajima D ($D = -2.090$, $p < 0.05$) testova. Na osnovu stope supstitucije koja za D-petlju iznosi 20% u milion godina procenjeno je da je do ekspanzije u okviru evropske subklade došlo pre oko 11500 generacija, odnosno pre oko 23000 godina.



Slika 12. Očekivane (Exp.) i dobijene (Obs.) vrednosti *mismatch* distribucije za kladu III u scenariju A) konstantne veličine populacije; B) populacione ekspanzije.

4.4. GENETIČKE ANALIZE MIKROSATELITA

Na osnovu Evanno ΔK metoda, rezultati genetičke klaster analize u softveru STRUCTURE su pokazali grupisanje analiziranih uzorka u tri različita klastera (Slika 13, Slika 14A), što je podržano i izračunavanjem dodatnih MaxMeaK i MaxMedK (Prilozi 3 i 4). U ovoj analizi se šest od sedam populacija iz istočne Srbije grupisalo u jedan klaster zajedno sa populacijom iz Crne Gore. Drugi klaster je činila preostala populacija iz istočne Srbije sa svim analiziranim populacijama iz zapadne Srbije, dok su jedinice iz populacije iz Slovenije činile treći klaster. Grafikon koji predstavljaju verovatnoću pripadanja svake jedinice nekom od klastera za nekoliko različitih vrednosti K ($K=2$ do $K=4$) su prikazani na Slici 15.



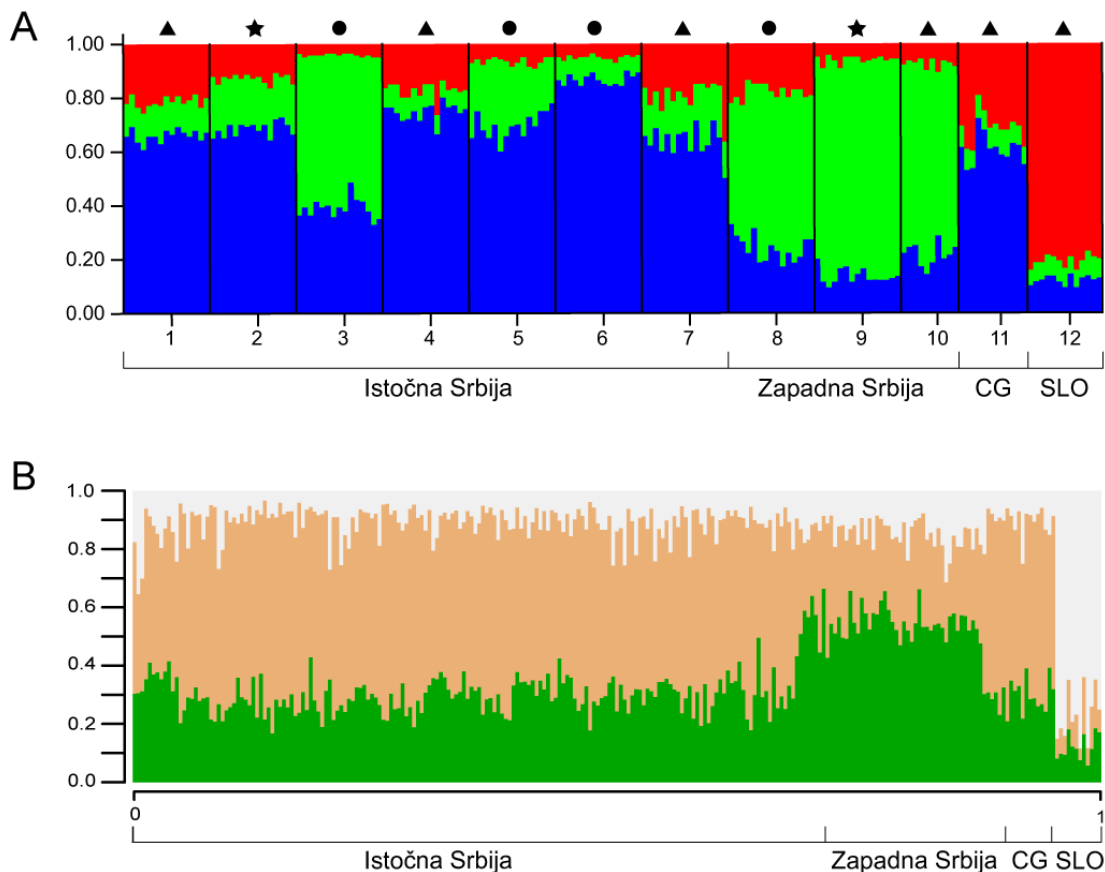
Slika 13. Delta K vrednosti iz STRUCTURE klaster analize

Tabela 4. G''_{ST} (ispod dijagonale) i Jost D (iznad dijagonale) vrednosti između parova genetičkih klastera dobijenih u STRUCTURE klaster analizi.

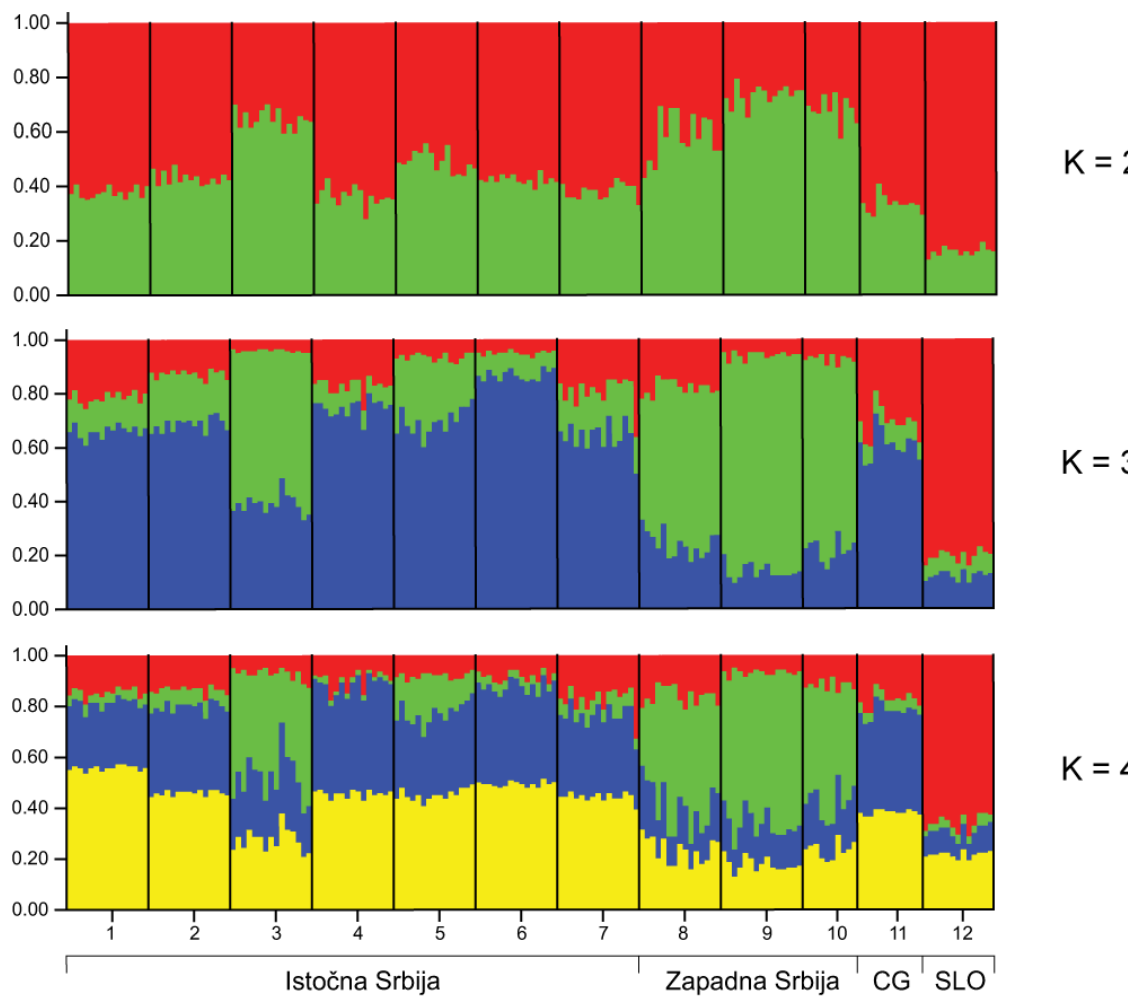
	1	2	3
1		0.112	0.268
2	0.130		0.253
3	0.304	0.286	

1 – istočna Srbija i Crna Gora; 2 – zapadna Srbija; 3 – Slovenija. Podebljane vrednosti ukazuju na statistički značajnu diferenciranost između parova klastera ($p < 0.001$).

Iako je na celom uzorku zabeležen prilično visok nivo admiksije (Slika 14), i Jost D i G''_{ST} vrednosti diferenciranosti za parove genetičkih klastera su ukazale na značajne nivoe diferencijacije između njih (Tabela 4), i dodatno podržale postojanje grupa koje su dobijene u STRUCTURE klaster analizi.

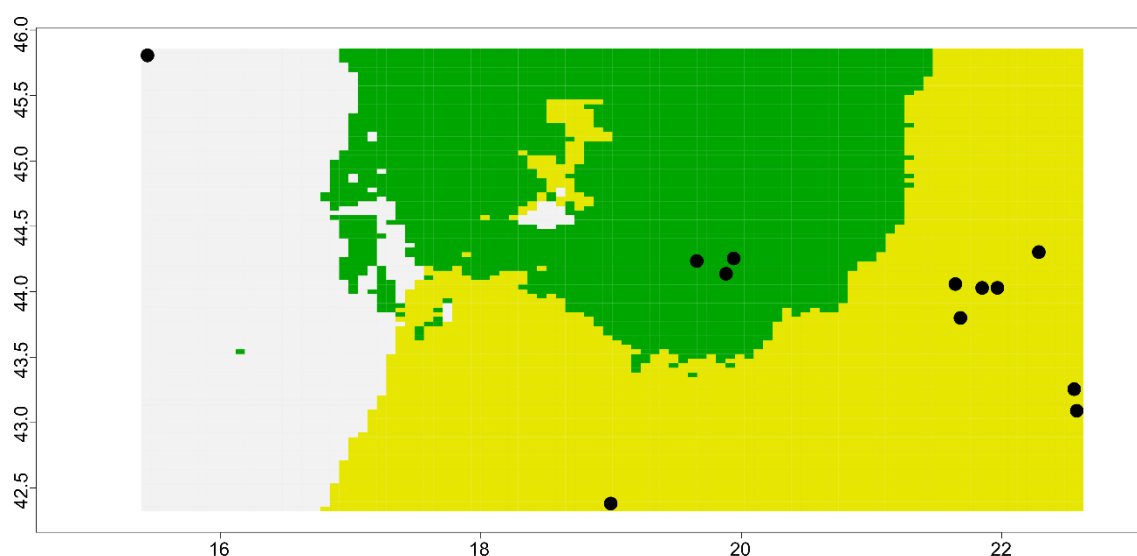


Slika 14. Verovatnoća pripadanja svake jedinke određenom klasteru. A) STRUCTURE grafikon za vrednost $K = 3$. Brojevi populacija odgovaraju brojevima datim u Tabeli 2; trougao – hibernacijska kolonija, zvezda – muška letnja kolonija, krug – porodiljska kolonija. B) GENELAND proporcije admiksije. Obeleženi geografski regioni odgovaraju onim datim u Tabeli 2.

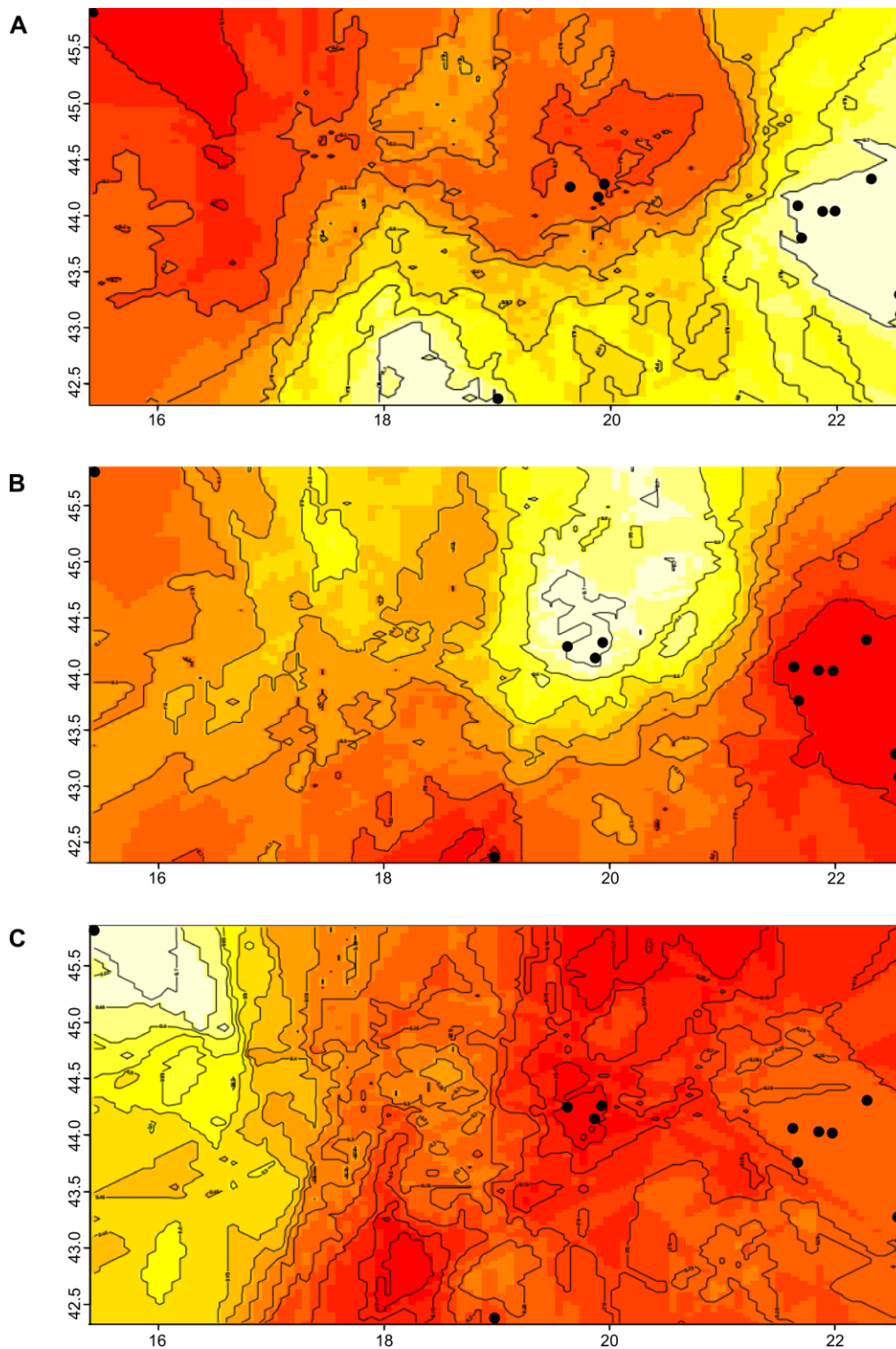


Slika 15. STRUCTURE grafikoni za različite vrednosti K. Svaki vertikalni stubić predstavlja genotip individue, dok su na y osi prikazane vrednosti verovatnoće pripadanja genotopova određenim klasterima. Brojevi populacija odgovaraju brojevima u Tabeli 2.

Kada je prilikom klaster analize uzeta u obzir informacija o geografskoj lokaciji svake od uzorkovanih populacija (GENELAND analiza), rezultati su takođe ukazali na postojanje tri klastera (Slika 14B). Iako je na celom analiziranom uzorku evidentno postojanje velikog nivoa admiksije, populacije i dalje imaju tendenciju grupisanja u tri klastera koji se međusobno razlikuju. Tendencija grupisanja populacija u 3 klastera je zabeležena i na mapama posteriorne verovatnoće pripadnosi određenom klasteru u GENELAND-u (Slike 16 i 17).



Slika 16. Procenjena pripadnost populacija određenim klasterima na osnovu GENELAND analize. Žuta boja – istočna Srbija i Crna Gora; zelena – zapadna Srbija; bela – Slovenija. Na x osi su stepeni geografske dužine, a na y osi stepeni geografske širine.



Slika 17. Mape posteriorne verovatnoće za pripadnost populacije određenom klasteru. Najsvetliji delovi mape predstavljaju najveću verovatnoću. Na x osi su stepeni geografske dužine, a na y osi stepeni geografske širine. A – klaster istočna Srbija i Crna Gora; B – klaster zapadna Srbija; C – Slovenija.

Svi analizirani mikrosatelitni lokusi su bili polimorfni. Zabeleženo je 7-13 alela po lokusu, a dobijena heterozigotnost je bila u rasponu 0.482–0.835 (Tabela 5). Značajno odstupanje od Hardi-Vajnbergove ravnoteže je uočeno za lokuse RM003 i RM011. Koeficijent inbridinga (F_{IS}) je takođe bio statistički značajno veći od nule kod oba lokusa, što je verovatno bilo uzrokovano prisustvom nultih alela, s obzirom na to da su za ova dva lokusa nulti aleli bili detektovani u polovini analiziranih populacija. Ni jedan od analiziranih lokusa nije bio u gametskom (*linkage*) disekvilibrijumu.

Tabela 5. Deskriptivna statistika za osam analiziranih mikrosatelitskih lokusa

Lokus	Dužina	N_A	R	H_O	H_E	F_{IS}	H-W
RE007	120-158	9	5.80	0.794	0.802	-0.006	n.s.
RE017	187-201	8	4.07	0.741	0.695	-0.080	n.s.
RM002	386-438	13	5.95	0.796	0.804	0.023	n.s.
RM003	373-413	11	6.24	0.609	0.819	0.254	*
RM010	469-513	12	7.35	0.835	0.865	0.031	n.s.
RM011	374-402	8	4.47	0.482	0.685	0.312	*
RM015	178-198	7	4.03	0.669	0.687	0.017	n.s.
RM025	119-135	8	4.41	0.629	0.631	-0.019	n.s.

N_A – broj alela, R – bogatstvo alela, H_O – dobijena heterozigotnost, H_E – očekivana heterozigotnost, F_{IS} – indeks fiksacije, H-W – značajnost testova za odstupanje od HWE (* statistički značajno na nivou $p < 0.05$, n.s. – nije statistički značajno)

Na nivou populacija, genski diverzitet i uočena heterozigotnost su bili slični među populacijama (Tabela 6). Vrednosti indeksa fiksacije (F_{IS}) za pojedinačne kolonije nisu bili značajno različiti od nule, ukazujući na to da unutar tih kolonija nema značajnog inbridinga. Takođe nije zabeležena značajna razlika u genetičkoj varijabilnosti među različitim tipovima kolonija kada je analiziran broj alela [$F_{(2,9)} = 0.53$, $p = 0.609$], dobijena heterozigotnost [$F_{(2,9)} = 0.56$, $p = 0.588$] i koeficijent inbridinga [$F_{(2,9)} = 0.35$, $p = 0.711$].

Tabela 6. Genetička varijabilnost unutar analiziranih kolonija

Kolonija	N _A	H _O	H _E	F _{IS}
1	6.875	0.724	0.734	0.041
2	6.375	0.679	0.716	0.081
3	7.625	0.725	0.749	0.047
4	6.500	0.724	0.745	0.049
5	6.375	0.660	0.717	0.108
6	6.500	0.719	0.737	0.054
7	7.500	0.703	0.738	0.064
8	6.125	0.690	0.728	0.080
9	5.750	0.667	0.704	0.101
10	5.500	0.622	0.685	0.146
11	6.000	0.708	0.727	0.068
12	5.875	0.740	0.737	0.036

N_A – prosečan broj različitih alela na nivou svih lokusa, H_O – dobijena heterozigotnost, H_E – očekivana heterozigotnost, F_{IS} – koeficijent inbridinga.

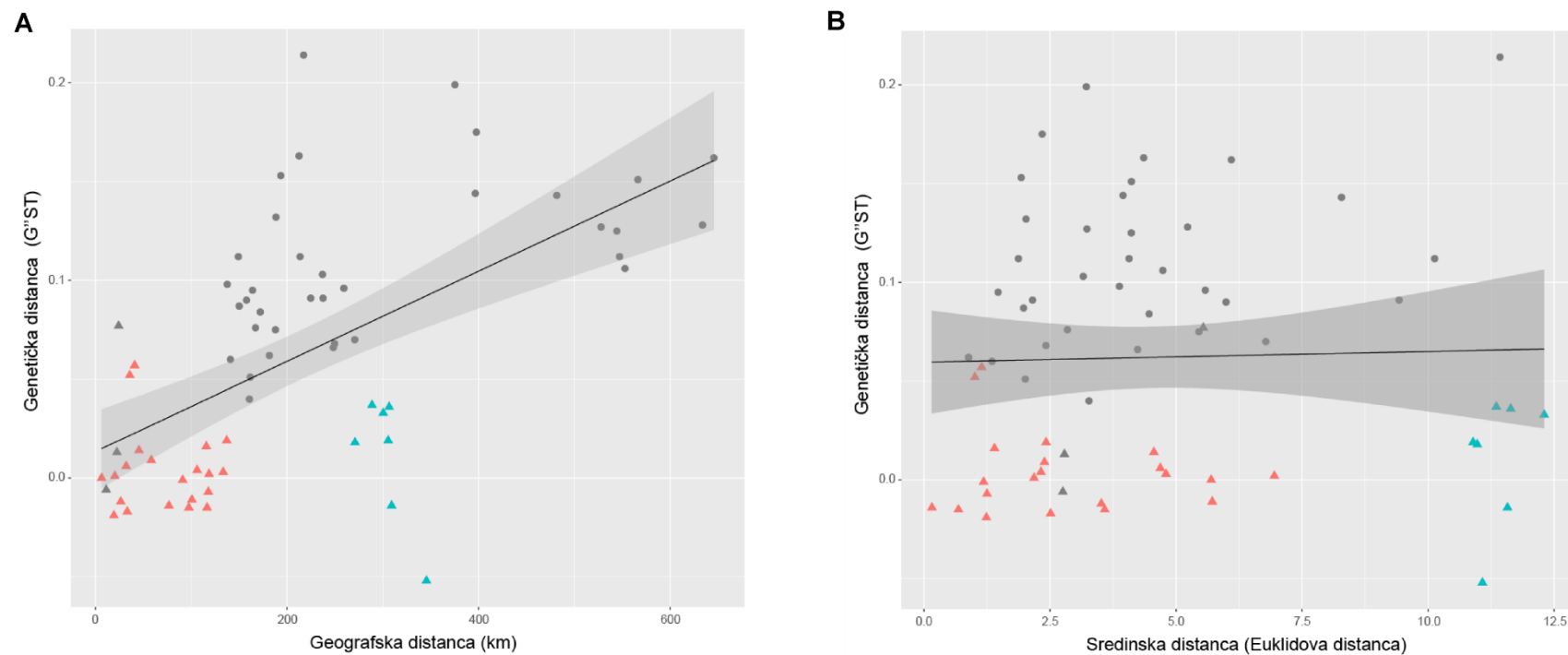
F_{ST} vrednosti između parova analiziranih populacija su bile relativno niske, i bile su u rasponu između -0.004 i 0.064 (Tabela 7). Jost's D i G''_{ST} vrednosti su pokazale malo više nivoe diferencijacije između parova populacija, a dobijene vrednosti za oba analizirana parametra su slične (Prilozi 5 i 6). Kolonija iz Slovenije, koja je geografski najudaljenija od ostalih kolonija, se statistički značajno razlikovala od ostalih populacija na osnovu sva tri analizirana parametra. Kolonija iz Crne Gore se značajno razlikovala od svih kolonija u zapadnoj Srbiji, ali ne i od kolonija u istočnoj Srbiji. U većini slučajeva se kolonije u okviru jedne geografske regije nisu međusobno značajno razlikovale. Takođe, nije bilo značajne diferencijacije između različitih tipova kolonija

Tabela 7. F_{ST} vrednosti (ispod dijagonale) i p vrednosti za značajnost genetičke diferencijacije (iznad dijagonale) između parova populacija.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		0.344	0.242	0.026	0.653	0.562	0.202	0.000	0.000	0.008	0.932	0.000
2	0.004		0.423	0.611	0.642	0.698	0.443	0.003	0.040	0.143	0.157	0.000
3	0.004	0.022		0.449	0.343	0.688	0.368	0.000	0.063	0.108	0.140	0.000
4	0.015	-0.001	0.001		0.043	0.679	0.164	0.001	0.015	0.088	0.284	0.000
5	-0.002	-0.001	0.003	0.015		0.472	0.388	0.002	0.014	0.074	0.299	0.000
6	0.000	-0.002	-0.002	-0.002	0.002		0.860	0.002	0.001	0.044	0.624	0.000
7	0.005	0.002	0.002	0.005	0.003	-0.004		0.000	0.012	0.077	0.116	0.000
8	0.036	0.027	0.024	0.024	0.032	0.024	0.020		0.595	0.069	0.016	0.000
9	0.041	0.019	0.012	0.022	0.026	0.029	0.021	0.000		0.393	0.009	0.000
10	0.042	0.016	0.014	0.019	0.024	0.023	0.018	0.020	0.007		0.003	0.000
11	-0.011	0.011	0.010	0.006	0.008	-0.001	0.011	0.026	0.032	0.058		0.000
12	0.055	0.052	0.045	0.045	0.050	0.052	0.058	0.054	0.062	0.064	0.054	

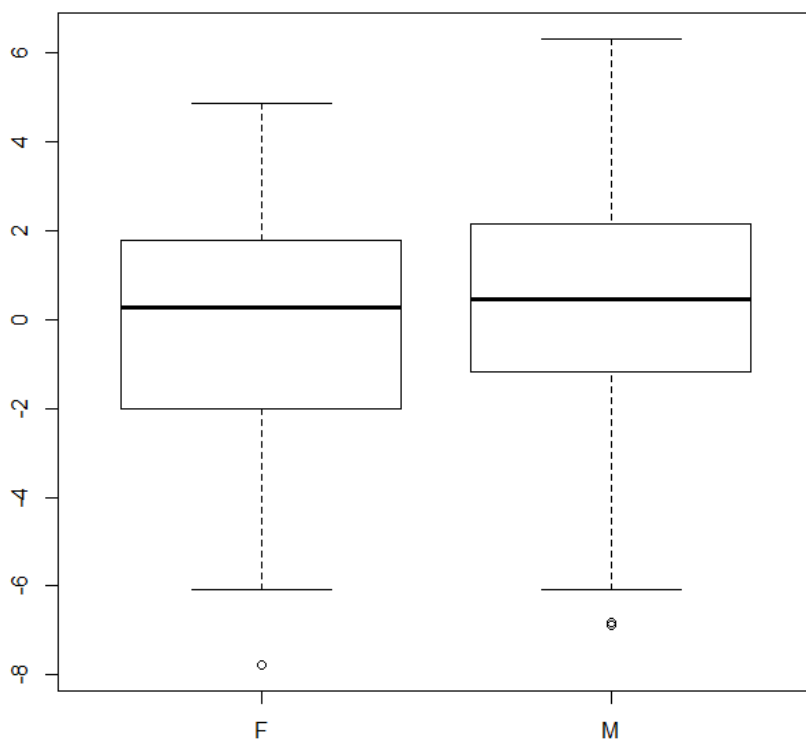
Podobljane vrednosti predstavljaju stepen diferencijacije između populacija koji je statistički značajno veći od očekivanog stepena između dve nasumične populacije. Brojevi populacija odgovaraju brojevima datim u Tabeli 2. Nijansama sive boje je predstavljena međusobna geografska udaljenost lokaliteta □ 0-150 km, ■ 151-300 km, ■ 301-450 km i ■ > 450 km.

Rezultati dobijeni analizom molekularne varijanse (AMOVA) su ukazali na to da većina genetičke varijabilnosti (95.3%, $p < 0.001$) potiče od varijabilnosti između jedinki unutar kolonija, dok je najmanji deo vezan za varijabilnost među kolonijama unutar genetičkih klastera (0.32%, $p = 0.235$). Genetička varijabilnost među klasterima je statistički značajna ($p < 0.001$) i iznosi 4.38%. Analiza izolacije putem distance primenom Mantel testa je ukazala na postojanje značajne korelacije između geografskih i genetičkih distanci (Slika 18A) između populacija sredozemnog potkovičara ($r = 0.732$, $p < 0.01$). Isti rezultati su dobijeni i primenom dodatnih Mantel testova gde su kao matrice genetičkih distanci bile korišćene matrice Jost D i G''_{ST} vrednosti. Rezultati parcijalnog Mantel testa, nakon uklanjanja efekta geografske varijabilnosti, pokazali su da ne postoji značajna korelacija između genetičkih i sredinskih distanci $r = -0.228$, $p = 0.871$ (Slika 18B).



Slika 18. Grafikoni povezanosti između A) genetičkih i geografskih distanci; i B) genetičkih i sredinskih distanci. Trougao – parovi populacija koji pripadaju istom genetičkom klasteru, krug – parovi populacija koji pripadaju različitim genetičkim klasterima (istočna Srbija i Crna Gora su smatrane jednim genetičkim klasterom na osnovu svih prethodnih analiza). Crveni trouglovi predstavljaju parove populacija unutar istočne Srbije, a plavi trouglovi parove populacija iz istočne Srbije sa populacijom iz Crne Gore.

Analize disperzije između polova su pokazale da ne postoji značajna razlika u disperziji između mužjaka i ženki (Slika 19). Rezultati ni jednog od četiri testa nisu bili statistički značajni (Tabela 8).



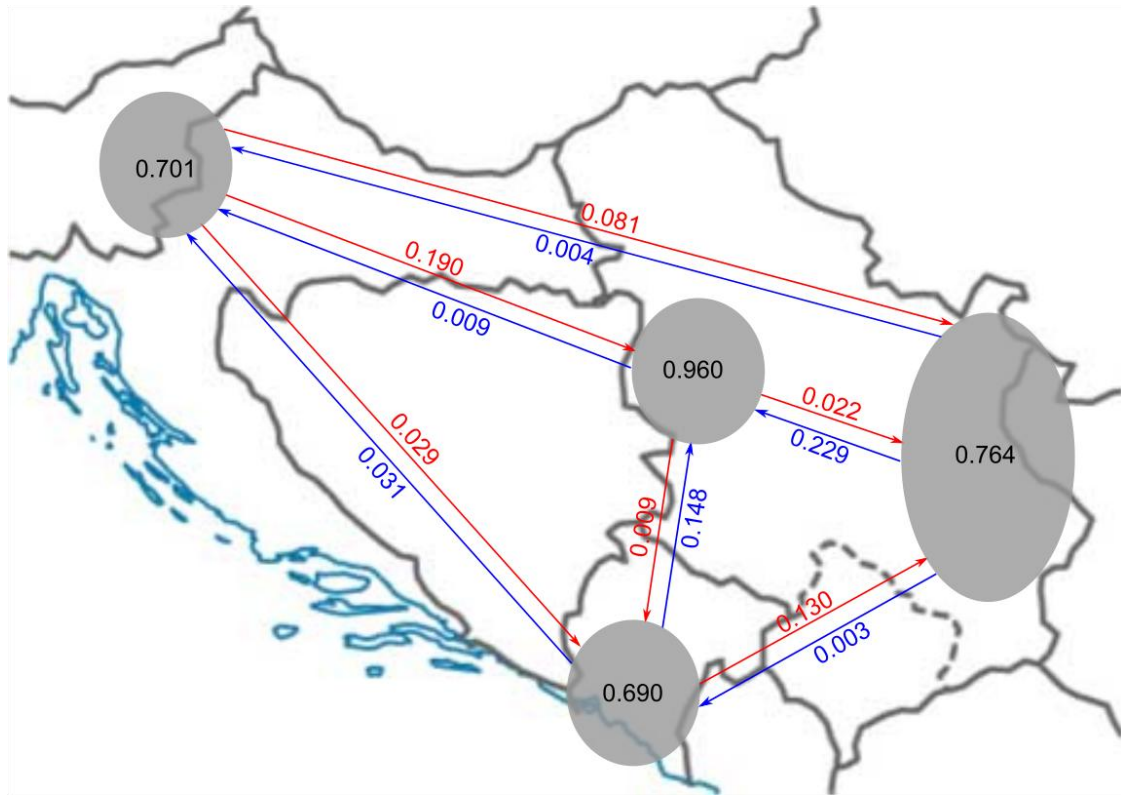
Slika 19. Vrednosti korigovanog indeksa pripadnosti (AIC) među polovima predstavljene medijanom i kvartilima; o – autlajeri; F – ženke; M – mužjaci.

Tabela 8. Rezultati dvostranog t-testa disperzije između polova

	mAIC	vAIC	F_{IS}	F_{ST}
t vrednost	-0.8354	0.9927	0.0088	-0.0092
p	0.345	0.433	0.731	0.214

mAIC – srednja vrednost korigovanog indeksa pripadnosti; vAIC – varijansa korigovanog indeksa pripadnosti; F_{IS} – inbriding koeficijent individue u odnosu na grupu, F_{ST} – mera diferencijacije između grupa.

BayesAss analize su pokazale da tokom poslednje dve generacije nije bilo značajne stope migracije između populacija koje pripadaju različitim geografskim regijama (Slika 20).



Slika 20. Stope migracija u poslednje dve generacije unutar i između geografskih regija (populacije i geografske regije su navedene u Tabeli 2).

Prosečan stepen srodnosti među članovima kolonija je bio blizu nule u svim analiziranim populacijama. Procenat rođaka među jedinkama unutar kolonija ($r \geq 0.25$) je iznosio između 8.5–16.21%, 9.52–17.68 % i 4.54–20 %, u porodijskim, letnjim muškim i hibernacijskim kolonijama (Tabela 9). Tip kolonije nije imao značajan efekat na stepen srodstva među članovima kolonije [$F_{(2,9)} = 1.00$, $p = 0.405$], ni na procenat srodnih jedinki unutar [$F_{(2,9)} = 0.13$, $p = 0.883$].

Tabela 9. Srodnost jedinki u okviru različitih tipova kolonija

Kolonija	Tip kolonije	Srednja srodnost	QGEst ≥ 0.25
Canetova pećina	hibernacijska	0.0062	11.11 %
Bela Sala	muška letnja	0.0306	17.62 %
Ljubinkova pećina	porodijska	-0.0083	9.41 %
Lazareva pećina	hibernacijska	0.0002	10.51 %
Pećurski kamen	porodijska	0.0180	8.50 %
Temska	porodijska	0.0004	11.96 %
Držinska pećina	hibernacijska/prelazna	0.0163	12.69 %
Petnička pećina	porodijska	0.0394	16.21 %
Tmuša	muška letnja	0.0481	9.52 %
Drenajička pećina	hibernacijska/prelazna	0.0613	20.0 %
Začirska pećina	hibernacijska/prelazna	0.0027	4.54 %
Kostanjeviška jama	hibernacijska	0.0366	15.38 %

QGEst – pokazatelj srodnosti između parova jedinki prema Queller i Goodnight (1989)

5. DISKUSIJA

5.1. DISTRIBUCIJA I BROJNOST SREDOZEMNOG POTKOVIČARA U SRBIJI

Distribucija sredozemnog potkovičara u Srbiji je ograničena na područja zapadne i istočne Srbije, i poklapa se sa distribucijom krečnjačkih područja u Srbiji (Đurović 1998; Paunović 2016). Svih 26 lokaliteta na kojima je *R. euryale* zabeležen prilikom prikupljanja materijala za ovu populaciono-genetičku analizu se nalaze u okvirima do sada poznatog areala vrste. Od toga, prisustvo ove vrste bilo je poznato na 15 lokaliteta, a na 11 je zabeleženo po prvi put. U Čebića pećini blizu Valjeva je u aprilu 2014. godine uhvaćeno pet odraslih mužjaka. Ovaj lokalitet najverovatnije predstavlja prelazno sklonište ove vrste između zimskih i letnjih skloništa, pošto je poznato da ne hibernira u ovoj pećini (Paunović 2016; lični podaci). Prilikom terenskih istraživanja slepih miševa Ovčarsko-Kablarske klisure, eholokacioni signali ove vrste u preletu su snimljeni nekoliko puta u blizini planinarskog doma „Kablar“ (Budinski 2013), ali nisu pronađena skloništa na tom području. Burazerović (2017) navodi nalaz ove vrste iz pećine Kađenica, u kojoj prilikom posete u aprilu 2013. godine nisu zabeleženi slepi miševi (Budinski 2013). Eholokacioni signali ove vrste su snimljeni u blizini ulaza u pećinu na Četanici (kanjon reke Mileševke) u julu 2013. godine, i ovaj nalaz predstavlja ujedno najjugozapadniji nalaz *R. euryale* u Srbiji, kao i nalaz na najvećoj nadmorskoj visini, 1335 metara (Budinski i sar. 2016; Paunović 2016). Mnogo veći broj nalaza je zabeležen u istočnoj Srbiji. Zahvaljujući fotografijama speleologa, pronađene su tri nove hibernacijske kolonije sredozemnih potkovičara u Maloj Bizdanji, Ranjenoj pećini i u Vetrenoj Dupki. Od ova tri lokaliteta, samo u Ranjenoj pećini je procenjena brojnost kolonije srednjih potkovičara na oko 3000 jedinki. U kolonije je bilo približno 2300 jedinki *R. euryale*, a ostatak su, u mnogo manjem broju, činili *R. blasii* i *R. mehelyi* (Paunović i sar. 2018). Od tri vrste srednjih potkovičara, *R. euryale* je najbrojnija i najšire rasprostranjena vrsta, i u kolonijama koje čine dve ili sve tri vrste srednjih potkovičara je uvek najbrojniji (Paunović 2016). Najverovatnije je da je ista situacija i sa kolonijama u Maloj Bizdanji i Vetrenoj Dupki. Te kolonije su najverovatnije sastavljene ili samo od jedinki sredozemnog potkovičara, ili je on najbrojnija vrsta u tim kolonijama.

Prisustvo porodiljske kolonije *R. euryale* u napuštenoj građevini kod sela Temska predstavlja veoma značajan nalaz, pošto je u pitanju jedina za sada poznata kolonija ove vrste u Srbiji koja se ne nalazi u podzemnom skloništu (kao što je pećina ili rudnik) već

je u nadzemnom skloništu koje je izgradio čovek. U pitanju je mešovita porodiljska kolonija koju čine vrste *Rhinolophus ferrumequinum* (obično oko 200-300 ženki), *R. euryale* (slična brojnost kao i *R. ferrumequinum*) i manji broj *Myotis emarginatus* (do 100 ženki). Prvi put je ova kolonija zabeležena tokom jula 2010 godine, i narednih godina je bila posećena još nekoliko puta. U tom periodu nije zabeležena značajna promena brojnosti kolonije, kao ni odnos brojnosti vrsta koje je čine. U većini areala (pa tako i na istraživanom području) sredozemni potkovičar koristi podzemna skloništa za porodiljske kolonije (Dietz i Kiefer 2016), dok je u severnim delovima areala, na području severne Mađarske i južne Slovačke, skoro 25% porodiljskih kolonija na tavanima, verovatno zbog nedostatka prirodnih skloništa (Uhrin i sar. 2012). U pećini na Rgotskom kamenu u blizini Bora su speleolozi pronašli „veliku koloniju“ srednjih potkovičara u avgustu 2015. godine. Međutim, prilikom posete objektu početkom septembra iste godine je pronađena samo jedna mlada ženka, što znači da se do tog momenta kolonija ili premestila u dublje delove pećine koji su biti teško dostupni, ili je već bilo došlo do disperzije jedinki.

Ponor Pandiralo je posećen u julu 2015 godine, kada je zabeležena velika kolonija (oko 3000 jedinki) vrsta *Myotis myotis/M. blythii* i *Miniopterus schreibersii*. Takođe je zabeleženo (vizuelno, na fotografijama, i pomoću ultrazvučnog detektora) prisustvo 20-ak jedinki sredozemnog potkovičara. Pećina je posećena tokom dana, zbog vode u objektu nije bilo moguće ući duboko i životinje su počele da lete, te se u objektu nije dugo zadržavalo, da bi se životinje što manje uznemiravale. Zbog toga nije bilo moguće utvrditi da li je u dubljim delovima pećine bilo više jedinki ove vrste, ni da li je u pitanju porodiljska kolonija, letnja kolonija mužjaka ili neki drugi tip kolonije. Slična situacija je bila i sa kolonijom u pećini iznad sela Rsovci. U julu 2010. godine je zabeleženo prisustvo kolonije srednjih potkovičara u toj pećini, ali nije procenjena brojnost niti utvrđen tip kolonije. Prilikom narednih poseta pećini (maj 2013. i jul 2015. godine) u njoj nisu bili zabeleženi slepi miševi. Pomoću ultrazvučnog detektora su u maju 2015. godine snimljeni eholokacioni signali ove vrste u preletu u blizini sela Krupac. U neposrednoj blizini za sada nije poznato ni jedno sklonište ove vrste, ali je taj kraj bogat pećinama koje još uvek nisu istražene. Takođe, na udaljenosti od oko 12 km se nalaze Ogorelička pećina i ponor Pandiralo gde je prisustvo ove vrste zabeleženo, i moguće je da jedinke iz tih skloništa love na ovom području.

U Ogoreličkoj pećini je u septembru 2016. godine zabeleženo prisustvo nekoliko subadultnih (rođenih tokom leta iste godine) jedinki sredozemnog potkovičara, što indirektno ukazuje na postojanje porodijske kolonije na ovom lokalitetu. Prisustvo ove vrste u Ogoreličkoj pećini je prvi put zabeležila Burazerović (2017), ali nije navedeno koji tip kolonije je bio u pitanju. Burazerović (2017) navodi prisustvo porodijske kolonije u Držinskoj pećini (=Velika pećina u Držini). Prilikom posete ovom objektu u maju 2013. godine je zabeležena mešovita kolonija *R. euryale* i *R. blasii* (gde je *R. euryale* činio oko 90%). S obzirom na to da kod uhvaćenih životinja nisu bili vidljivi znakovi gravidnosti, i da tokom narednih godina prilikom poseta ovom objektu u letnjem periodu nije nađena porodijska kolonija, ovaj lokalitet je bio okarakterisan kao prelazno sklonište sredozemnog potkovičara.

Još jedan zanimljiv nalaz je postojanje muške letnje kolonije u pećini Tmuša u zapadnoj Srbiji. Ovaj lokalitet je ranije bio okarakterisan kao kopulatorno sklonište *R. euryale* (Paunović 2016), a prisustvo muške letnje kolonije je prvi put zabeleženo tokom leta 2013. godine. Prethodno je bila poznata samo letnja kolonija mužjaka iz istočne Srbije, u pećini Bela Sala (Uhrin i sar. 2012), a drugi nalazi letnjih kolonija sredozemnog potkovičara sastavljenih samo od mužjaka nisu pronađeni u dostupnoj literaturi.

Paunović (2016) je procenio brojnost populacije sredozemnog potkovičara u Srbiji na oko 30000 jedinki, sa stabilnim populacionim trendom, i predloženom IUCN kategorijom ugroženosti – Najmanja briga (*LC – least concern*). Poslednjih nekoliko decenija su zabeleženi veliki padovi brojnosti populacija ove vrste širom areala, dok se populacije na Balkanskom poluostrvu smatraju stabilnim i najbrojnije su (Dietz i Kiefer 2016, Juste i Alcalde 2016). Rezultati istraživanja u okviru ove teze su u saglasnosti sa ranije dobijenim rezultatima, odnosno, nisu zabeležene nikakve značajne oscilacije u brojnosti u kolonijama koje su praćene, i smatra se da je trend populacija *R. euryale* u Srbiji stabilan.

5.2. METODE ZA IDENTIFIKACIJU

ISSR-PCR metod nije ranije korišćen za razlikovanje morfološki sličnih vrsta potkovičara, a ni drugih vrsta slepih miševa. Puechmaille i Teeling (2014) su za razlikovanje *Rhinolophus euryale* i sestrinske vrste *R. mehelyi* koristili razlike u sekvencama D-petlje i *Cytb* mitohondrijske DNK. Iako je uzorkovanje bilo neinvazivno (DNK je izolovana iz izmeta prikupljenog ispod hibernirajućih jedinki), ovaj pristup osim amplifikacije DNK zahteva naknadno sekvenciranje umnoženih produkata. Sekvenciranje jeste najpouzdaniji metod za razlikovanje vrsta, ali ponekad nije moguće zbog ograničenih finansijskih sredstava.

ISSR-PCR se ranije pokazao kao efikasan metod za razlikovanje nekih morfološki sličnih vrsta biljaka, insekata, riba, sisara i mnogih drugih taksona (Balasaravanan i sar. 2006; Maltagliati i sar. 2006; He i sar. 2007; Bugarski-Stanojević i sar. 2013). U ovoj studiji se ovaj metod takođe pokazao kao pouzdan i efikasan za razlikovanje dve vrste srednjih potkovičara, *R. euryale* i *R. blasii*. Iako su jasno definisani morfološki karakteri za razlikovanje ove dve vrste, nekada na terenu dolazi do pogrešne identifikacije, čemu je uglavnom uzrok neiskustvo istraživača. Pored toga postoji čitav niz razloga koji mogu dovesti do pogrešne determinacije. Određen broj jedinki ima intermedijarne morfološke karaktere. Nekada dolazi do oštećenja ili deformisanja kožnih nabora koji se koriste za razlikovanje vrsta. Kod juvenilnih jedinki falange prstiju krila još nisu potpuno razvijene, i nije uvek moguće sa sigurnošću utvrditi koja je vrsta u pitanju. Sve ovo zajedno ukazuje da je potreban efikasan metod koji bi povećao pouzdanost determinacije. ISSR-PCR metod bi se takođe mogao koristiti za identifikaciju ostataka uginulih jedinki.

U ovoj studiji su analizirane dve od tri vrste srednjih potkovičara koji naseljavaju Evropu, i sledeći korak bi bilo prikupljanje uzoraka i uključivanje u analizu treće vrste, *Rhinolophus mehelyi*.

5.3. FILOGEOGRAFIJA I DEMOGRAFSKA ISTORIJA

Na osnovu analiziranog seta sekvenci D-petlje mitohondrijske DNK uočeno je postojanje tri glavne monofiletske klade, od kojih dve odgovaraju uzorcima iz Irana (klada I i klada II), dok su u okviru treće grupisani uzorci iz Evrope, azijskog dela Turske i severne Afrike (klada III). Postojanje istih filogenetskih grupa su ranije ustanovili (Najafi i sar. 2018) na osnovu sekvenci D-petlje i *Cytb*. Dve Iranske klade geografski odgovaraju različitim regijama u toj državi, i isti autori sugerišu da su u Iranu za vreme glacijacija najverovatnije postojala dva različita refugijuma u kojima su populacije ove vrste preživele ledena doba i usled izolacije divergirale. Jedan od refugijuma je najverovatnije bio na jugozapadu zemlje, južno od planina Zagros, odakle potiču uzorci koji čine kladu I. Uzorci iz ostalih delova Irana su se grupisali u kladu II, i pretpostavlja se da potiču iz drugog refugijalnog područja *R. euryale* u Iranu koje je najverovatnije bilo severno od planina Elborz, u području blizu Kaspijskog mora. Sličan filogenetski obrazac je pronađen i kod dve vrste moljaca iz Irana, za koje je takođe predloženo postojanje ova dva refugijalna područja u Pleistocenu (Rajaei Sh i sar. 2013).

Bilgin i sar. (2008) sugerišu da je na Balkanskom poluostrvu najverovatnije postojao glacijalni refugijum sredozemnog potkovičara, i rezultati ove studije podržavaju scenario da klada III najverovatnije potiče iz refugijuma na Balkanu. Ovaj scenario je podržan velikim diverzitetom haplotipova na ovom području, kao i filogenetskim analizama i analizama mreže haplotipova. Pod-mreža haplotipova koja predstavlja kladu III ima zvezdastu strukturu, koja je indikator skorašnje populacione ekspanzije. Centralnu poziciju u mreži zauzima jedan haplotip koji ima najveću frekvenciju (Slika 11), a oko njega su raspoređeni brojni haplotipovi sa manjom frekvencijom koji se od centralnog haplotipa razlikuju u jednom ili svega nekoliko nukleotida. U ovoj pod-mreži je centralni haplotip H5 koji ima najveću frekvenciju i najveću geografsku rasprostranjenost (Italija, Crna Gora, zapadna i istočna Srbija, Albanija i Turska), i vrlo verovatno predstavlja ancestralni haplotip ove grupe. Isti haplotip je i u studiji Bilgin i sar. (2008) bio najrasprostranjeniji i predložen kao ancestralni. U Crnoj Gori su nađena dva haplotipa, a oba su prisutna i u Italiji i istočnoj Srbiji. Genetička sličnost između uzoraka iz Crne Gore i istočne Srbije je zabeležena i na nivou nuklearnih mikrosatelita.

U okviru klade III je jedan haplotip, H58, koji potiče sa prostora istočnog Mediterana, značajno različit od ostalih haplotipova, i postoji mogućnost da potiču iz različitih glacijalnih refugijuma. Područje oko Levantskog mora je najverovatnije predstavljalo refugijum vrste *Miniopterus schreibersii* za vreme poslednjeg glacijalnog maksimuma (Bilgin i sar. 2016), i isti region je možda bio refugijum i za vrstu *R. euryale*. Međutim, s obzirom na dostupnost samo jednog uzorka sa tog područja, izvođenje takvih zaključka bi bilo previše spekulativno, i neophodno je analizirati još uzoraka sa područja istočnog Mediterana da bi se ova hipoteza potvrdila ili odbacila. Çoraman i sar. (2013) su analizirali filogeografiju 33 vrste slepih miševa na području Anadolije primenom *NDI* i *Cytb* mitohondrijskih markera, i svi uzorci su se grupisali u jednu dobro podržanu monofiletsku kladu, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj tezi.

Uzorci iz Italije su se grupisali u jednu kladu (klada III) zajedno sa ostalim uzorcima iz Evrope, a dva haplotipa koja su nađena u Italiji su prisutna i na Balkanskom poluostrvu. Za vreme poslednjeg glacijalnog maksimuma, nivo Sredozemnog mora je bio mnogo niži nego što je danas, i u tom periodu je došlo do formiranja „kopnenih mostova“ (engl. *land bridges*) između Apeninskog i Balkanskog poluostrva (Shackleton i sar. 1984), omogućavajući protok gena između njih (Randi 2007; Ruedi i sar. 2008). Moguće je da je Apeninsko poluostrvo naseljeno populacijama sredozemnog potkovičara koje potiču sa Balkanskog poluostrva, što je rezultiralo u njihovoj genetičkoj sličnosti. Takođe je zanimljivo što su se i uzorci iz Francuske i Tunisa grupisali zajedno sa svim ostalim uzorcima iz Evrope. Pirinejsko poluostrvo je predstavljalo glacijalni refugijum za neke vrste slepih miševa kao što su *Barbastella barbastellus* (Rebelo i sar. 2012), *Plecotus austriacus* (Razgour i sar. 2013) i verovatno *Nyctalus leisleri* (Boston i sar. 2015). Pod pretpostavkom da je Pirinejsko poluostrvo predstavljalo glacijalni refugijum sredozemnog potkovičara odakle su nakon poslednjeg glacijalnog maksimuma kolonizovane teritorije jugozapadne Evrope i severne Afrike, bilo bi očekivano da su ovi uzorci genetički različiti od uzoraka sa Balkanskog poluostrva (zbog divergencije u alopatriji). Međutim, haplotipovi iz Francuske i severne Afrike se ne razlikuju mnogo od haplotipova koji su pronađeni na Balkanskom i Apeninskom poluostrvu, te je moguće da svi vode poreklo od zajedničke predačke populacije koja je tokom ledenih doba preživela na području Balkana, odakle je započela rekolonizacija. Za mnoge vrste biljaka i životinja je Balkansko poluostrvo igralo najveću ulogu kao glacijalni refugijum, dok su, zbog

planina koje ih oivičavaju, Iberijsko i Apeninsko poluostrvo imali srednji odnosno mali doprinos njihovom genetičkom diverzitetu. Moguće je da su sve evropske populacije rekolonizovane iz jednog glacijalnog refugijuma koji se nalazio na Balkanskom poluostrvu, kao što je bio slučaj sa *Myotis bechsteinii* (Kerth i sar. 2008) i *Nyctalus noctula* (Petit i sar. 1999). Međutim, zbog malog broja uzoraka (svega pet jedinki sa jednog lokaliteta) iz Italije, i odsustva uzoraka sa Pirinejskog poluostrva, nije moguće isključiti postojanje drugih glacijalnih refugijuma ove vrste na području Evrope.

Dobijeni rezultati podržavaju scenario populacione ekspanzije koja je započela u kasnom Pleistocenu. Sličan obrazac rasta populacija i nakon toga rekolonizacije Evrope iz balkanskog refugijuma je zabeležen kod još nekoliko vrsta slepih miševa. Rezultati Furmana i saradnika (2010) su pokazali da je jedan deo populacija *Miniopterus schreibersii* za vreme ledenih doba najverovatnije preživeo na području severne Bugarske i Trakije, odakle je nakon poslednjeg glacijalnog maksimuma došlo do širenja areala uz obale Sredozemnog i Crnog mora. U filogeografskim analizama *Myotis bechsteinii*, najveći diverzitet haplotipova je zabeležen na Balkanskom poluostrvu u poređenju sa ostatkom Evrope, i autori su sugerisali da je do rekolonizacije došlo iz balkanskih populacija posle poslednjeg glacijalnog maksimuma (Kerth i sar. 2008). Populacije vrste *Barbastella barbastellus* su preživele ledena doba u sva tri južnoevropska refugijuma. Nakon poslednjeg glacijalnog maksimuma je došlo do rekolonizacije centralne Evrope populacijama iz balkanskog refugijuma, dok su se na području zapadne Evrope proširile populacije poreklom sa Pirinejskog poluostrva (Rebelo i sar. 2012).

5.4. GENETIČKA STRUKTURIRANOST POPULACIJA

Na osnovu analize nuklearnih mikrosatelita u 12 populacija sredozemnog potkovičara na Balkanu, zabeležen je veliki genetički diverzitet. Svi lokusi su bili polimorfni i ni u jednoj od populacija nije zabeležen značajan stepen inbridinga. Iako slepi miševi imaju mogućnost letenja koje može imati homogenizujući efekat na genetički diverzitet, na analiziranom području je uočena određena genetička sub-strukturiranost. Između populacija ove vrste je zabeležena izolacija putem distance, pri čemu su

geografski najudaljenije populacije bile međusobno genetički najrazličitije. Ova pojava je takođe zabeležena i kod kongeneričke vrste *Rhinolophus ferrumequinum* Rossiter i sar. (2007) i kod drugih sedentarnih vrsta slepih miševa kao što su *Myotis myotis* (Castella i sar. 2001) i *Plecotus auritus* (Burland i sar. 1999).

Na području centralnog Balkana je zabeležen visok stepen admiksije, i na prvi pogled nije bilo očiglednog obrasca genetičkog diferenciranja. Međutim, brojne analize su podržale postojanje tri odvojene grupe na analiziranom području, pri čemu su prvu činile populacije iz istočne Srbije zajedno sa populacijom iz Crne Gore, drugu populacije iz zapadne Srbije, dok se populacija iz Slovenije izdvojila kao zasebna. Iako je postojanje ove tri grupe statistički značajno podržano, grupisanje populacije iz Crne Gore sa populacijama iz istočne Srbije nije očekivano, s obzirom na to da su te populacije prilično međusobno udaljene. Frantz i sar. (2009) su pokazali da je u slučaju seta populacija koje karakteriše prisustvo izolacije putem distance, ponekad teško objasniti postojanje genetičkih klastera u biološkom kontekstu.

Grupa koju su činile populacije iz zapadne Srbije se uvek prva izdvajala u klaster analizama, i ove populacije su pokazale statistički značajnu diferenciranost od skoro svih ostalih analiziranih populacija iz preostale dve grupe. Udaljenost između kolonija u zapadnoj i istočnoj Srbiji je veća od 100 km, i na području centralne Srbije ne postoji mnogo prirodnih skloništa niti su poznati noviji nalazi ove vrste, i očekivano je da će udaljenost i odsustvo adekvatnih skloništa predstavljati barijeru za protok gena između ove dve geografske regije. U Karpatskom regionu su zabeležene sezonske migracije *R. euryale* do 16.7 km, dok su u Bugarskoj zabeležene veće distance koje pripadnici ove vrste prelaze između zimskih i letnjih skloništa, do 58.8 km (Dietz i sar. 2009a). Kao što je i očekivano, mnogo veća genetička diferenciranost je zabeležena između geografskih regiona, nego između populacija unutar regiona. Ovo je podržano i kontrolnim nalazima prethodno markiranih predstavnika ove vrste u Srbiji, gde su sezonske migracije zabeležene unutar jedne geografske regije, a ne i između različitih geografskih regija (Paunović 2016; Pejić i sar. 2018, lični podaci). Takođe, rezultati recentnih migracija pomoću BayesAss programa nisu pokazali da je bilo značajnih migracija između geografskih regija u protekle dve generacije.

Zanimljiv je rezultat da postoji značajna genetička diferenciranost između kolonija iz zapadne Srbije i kolonije iz Crne Gore (obe regije su u okviru Dinarida), koja uveliko prevazilazi genetičke razlike između populacija u istočnoj Srbiji i Crnoj Gori (odnosno populacija na području Karpato-Balkanida i Dinarida). Moguće je da visoke planine na severu Crne Gore predstavljaju fizičku barijeru između ove dve regije, i u određenoj meri sprečavaju protok gena između njih. Još zanimljiviji rezultat predstavlja genetička sličnost između populacija u istočnoj Srbiji sa populacijom u Crnoj Gori. Na osnovu rezultata koji su pokazali da postoji značajna izolacija putem distance između populacija na Centralnom Balkanu, očekivano je da ove populacije genetički budu mnogo više različite, s obzirom da su međusobno udaljene 270-345 km. Jedan od potencijalnih uzroka ovakvih sličnosti bi mogli biti sredinski faktori, ali primenom parcijalnog Mantel testa nije dobijena značajna korelisanost između genetičkih i sredinskih razlika, tako da se efektom sredinskih faktora ne može objasniti ova genetička sličnost. Još uvek nije najjasnije šta je dovelo do genetičke sličnosti ovih populacija. U svim klaster analizama su se grupisale zajedno, i nije zabeležena značajna genetička diferenciranost između populacije iz Crne Gore i populacija iz istočne Srbije, što ukazuje na to da možda postoji protok gena između njih. Jedno od mogućih objašnjenja ove sličnosti bi moglo biti postojanje velikog broja populacija između njih, na području Albanije i južnih delova Srbije. *R. euryale* je zabeležen u okolini Skadarskog jezera i na području Koraba u Albaniji (Théou i Bego 2018), i postoje istorijski nalazi ove vrste iz okoline Peći (Paunović 2016). U nedostatku više podataka o distribuciji ove vrste na području Albanije i Kosova i Metohije, nije moguće dodatno potvrditi ovu pretpostavku. Takođe ne postoje nalazi sredozemnog potkovičara na području južne Srbije, gde odsustvuju krečnjački predeli. Iako ne postoje prirodne pećine, moguće je da ova vrsta ipak naseljava to područje, i da koristi alternativna skloništa kao što su građevine, kao što je to slučaj u karpatskom regionu (Uhrin i sar. 2012), ili alternativna podzemna skloništa kao što su rudnici. Alternativno objašnjenje sličnosti između ove dve geografske regije bi mogla biti homoplazija mikrosatelita. Prilikom analize mikrosatelita se analizira samo dužina fragmenta, a ne i sama sekvenca, i moguće je da različite kopije jednog lokusa budu identične dužine, a da se razlikuju u sekvencama nukleotida, tako da analiza takvih fragmenata može dovesti do pogrešnih procena stopa migracija i genetičke sličnosti između određenih populacija (Estoup i sar. 2002). Međutim, mala je verovatnoća da je

istovremeno došlo do homoplazije na velikom broju lokusa. Prilikom analize sekvenci D-petlje mitohondrijske DNK su takođe dobijeni rezultati koji ukazuju na genetičku sličnost ova dva geografska regiona, odnosno ova dva geografska dele iste haplotipove.

Umerena genetička diferenciranost koja je pronađena između analiziranih kolonija sredozemnog potkovičara se može objasniti osobinama vrste kao što su sedentarnost (ili migracije na kratke distance) i privrženost skloništu, zajedno sa izolacijom putem distance. Slično ostalim vrstama iz ovog roda, *Rhinolophus euryale* ima male vrednosti za parametre *WL* i *AR*, što predstavlja morfološka ograničenja za letenje na duže distance, odnosno duže migracije bi bile energetski veoma skupe (Norberg i Rayner 1987; Burland i Worthington Wilmer 2001). Privrženost skloništima je kod ove vrste i ranije zabeležena. Jedinke oba pola pokazuju priverženost hibernacijskim skloništima, a ženke pokazuju priverženost skloništima u kojima se nalaze porodiljske kolonije. Takođe je zabeležena priverženost mužjaka letnjem skloništu, jedan mužjak markiran u pećini Bela Sala u istočnoj Srbiji je ponovo uhvaćen na istom lokalitetu posle 12 godina. Privrženost skloništu vrlo često može da vodi do povećane stope inbridinga i do inbriding depresije (Furmankiewicz i Altringham 2007). Međutim, rezultati ovih istraživanja nisu pokazali da postoje znakovi inbriding depresije u populacijama ove vrste na Balkanu. Slični rezultati su dobijeni kod još nekoliko sedentarnih vrsta slepih miševa. Kao mehanizmi izbegavanja inbriding depresije navedeni su disperzija mužjaka i parenje sa jedinkama iz drugih kolonija (Kerth i sar. 2003; Furmankiewicz i Altringham 2007). Kod slepih miševa su mužjaci pol koji ima veću sposobnost disperzije, čime se smanjuje diferenciranost između kolonija (Burland i Worthington Wilmer 2001). Međutim, rezultati dobijeni u ovom istraživanju nisu podržali tu pretpostavku, s obzirom a to da nije bilo značajnih razlika u disperziji između mužjaka i ženki u analiziranom uzorku.

Analize srodstva su pokazale vrlo niske vrednosti (blizu nule) pokazatelja srednje srodnosti između članova iste kolonije. Slični rezultati su zabeleženi kod još nekih evropskih vrsta slepih miševa kao što su *Myotis bechsteinii* (Kerth i sar. 2002), *Nyctalus noctula* (Petit i sar. 1999), *Plecotus auritus* (Burland i sar. 2001) i *Rhinolophus ferrumequinum* (Rossiter i sar. 2002). Ove vrste karakteriše različita preferencija prema skloništu. *R. ferrumequinum* koristi skloništa u pećinama ili građevinama, *N. noctula* i *P. auritus* u drveću ili građevinama, a *M. bechsteinii* isključivo u drveću (Dietz i Kiefer 2016). *N. noctula* je migratorna vrsta, dok se preostale smatraju sedentarnim (Hutterer i

sar. 2005), a ove vrste se razlikuju i po veličini kolonija koje prave. Biologija ovih vrsta se dosta razlikuje, a kod svih njih je zabeležena mala prosečna srodnost između jedinki unutar kolonije, i veoma izražena filopatridija. Kerth i saradnici (2003) su sugerisali da je to najverovatnije posledica autbridginga. U svim gore pomenutim studijama je bila analizirana srodnost između jedinki u okviru porodiljskih kolonija. Za razliku od toga, u studijama gde je poređena srodnost jedinki unutar porodiljskih kolonija i kolonija formiranih u periodu rojenja pokazano je da je prosečna srodnost između jedinki veća u porodiljskim kolonijama u odnosu na prelazne kolonije gde se životinje roje (Rivers i sar. 2005; Bogdanowicz i sar. 2012; Johnson i sar. 2015). Ovi rezultati ukazuju na to da se varijabilnost vrste održava tako što se jedinke iz velikog broja kolonija tokom perioda parenja sreću upravo u prelaznim kolonijama. Ova strategija povećava protok gena između populacija, uprkos preferenci jedinki da se godinama vraćaju u iste skloništa. Parenje kod *Rhinolophus euryale* se obično dešava u prelaznim skloništima tokom jeseni ili u hibernacijskim skloništima (Dietz i sar. 2009b). Pod pretpostavkom da se životinje iz različitih letnjih skloništa okupljaju u prelaznim i/ili zimskim skloništima radi parenja i hibernacije, bilo je očekivano da te kolonije karakteriše veća genetička raznovrsnost i manja srodnost među jedinkama (Johnson i sar. 2015). Međutim, to nije zabeleženo u ovim istraživanjima. Nije pronađena nikakva značajna razlika u genetičkom diverzitetu ni u stepenu srodstva u okviru porodiljskih, muških letnjih i hibernacijskih kolonija.

Ženke sredozemnog potkovičara karakteriše natalna filopatridija, ali su rezultati pokazali da većina ženki unutar porodiljskih kolonija nije u bliskom srodstvu, te je najverovatnije da srodstvo nije glavni faktor koji dovodi do grupisanja jedinki u kolonije. Mnogo je verovatnije da korist koju ženke imaju od grupne termoregulacije i transfer informacija o pogodnim skloništima i lovnim teritorijama igraju važnu ulogu prilikom formiranja i održavanja porodiljskih kolonija (Neuweiler 1993; Rossiter i sar. 2002). Stepenu srodstva između mužjaka u okviru muških letnjih kolonija se takođe nije značajno razlikovao od ostalih kolonija, i, slično kao i kod ženki, srodstvo najverovatnije nije uzrok grupisanja mužjaka. Za razliku od ženki, mužjaci tokom leta imaju manje termalne potrebe, i tokom dana mogu da ulaze u stanje torpora, i za njih grupna termoregulacija nije od ključnog značaja, i verovatno ni ona nije uzrok formiranja muških kolonija. Nekoliko studija je za cilj imalo objašnjavanje socijalnosti mužjaka, i predloženo je nekoliko potencijalnih faktora koji leže u osnovi formiranja muških kolonija tokom leta

(Safi i Kerth 2007). Safi i Kerth (2007) su pronašli da je kod mužjaka mnogih vrsta slepih miševa koje su rasprostranjene u umerenim klimatskim područjima kolonijalnost mnogo više povezana sa uspešnošću lova nego sa termoregulacijom. Međutim, njihovi rezultati se odnose na vrste koje love na otvorenom prostoru, dok su krila *R. euryale* prilagođena za lov u zatvorenom sklopu vegetacije (Norberg i Rayner 1987). Zbog različitih staništa gde love, drugačijeg načina leta i strategija lova, moguće je da se njihovi rezultati ne mogu primeniti na ovu vrstu, i pitanje koji mehanizam promovise grupisanje mužjaka sredozemnog potkovičara u kolonije tokom leta i dalje ostaje otvoreno.

6. ZAKLJUČCI

Ova doktorska disertacija predstavlja prvu analizu genetičkog diverziteta sredoziemnog potkovičara na području Srbije i centralnog Balkana upotrebom jedarnih mikrosatelita i sekvenci mitohondrijske DNK.

Sredozemni potkovičar *Rhinolophus euryale* Blasius, 1853 je do sada zabeležen na ukupno 73 lokaliteta u Srbiji, od koji se većina nalazi u krečnjačkim područjima. Sva skloništa, osim jednog, se nalaze u podzemnim objektima kao što su pećine, jame i napušteni rudnici, što potvrđuje litofilni karakter ove vrste. Procenjeno je da ova vrsta ima stabilan populacioni trend na teritoriji Srbije, i nisu zabeleženi značajni faktori ugrožavanja populacija sredoziemnog potkovičara.

Iako postoje definisani morfološki karakteri za razlikovanje vrsta srednjih potkovičara, još uvek nisu retke greške u identifikaciji tih vrsta na terenu. Upotrebom ISSR-PCR markera je moguće brzo i sa velikom pouzdanošću razlikovati vrstu *Rhinolophus euryale* od morfološki slične vrste južni potkovičar, *R. blasii*. Sledeći korak bi bio uključivanje treće vrste srednjih potkovičara (tamnooki potkovičar, *R. mehelyi*) u analizu.

Na području Balkanskog poluostrva je ustanovljen veliki diverzitet haplotipova D-petlje mitohondrijske DNK. Analize ovog markera ukazuju na relativno skoru i brzu populacionu ekspaniju. Procenjeno je da je do ekspanije došlo u kasnom Pleistocenu, pre oko 23000 godina. Dobijeni rezultati podržavaju hipotezu da je Balkansko poluostrvo najverovatnije predstavljalo jedan od glacijalnih refugijuma ove vrste u Evropi.

Ova studija predstavlja prvu populaciono-genetičku analizu sredoziemnog potkovičara upotrebom mikrosatelitskih markera, a ujedno i prvu studiju tog tipa kod slepih miševa na području centralnog Balkana. Populacije karakteriše veliki genetički diverzitet na nivou jedarne DNK. Zabeležen je umereni nivo diferencijacije između geografskih regiona, i značajna izolacija putem distance. Genetička diferenciranost između populacija u zapadnoj i istočnoj Srbiji je mala ali značajna, što se može objasniti sedentarnošću i filopatrijom. Populacija iz Crne Gore je genetički slična populacijama iz istočne Srbije, što ukazuje na potencijalno postojanje kolonija ove vrste između tih regiona.

Srodnost između jedinki nema značajnu ulogu u formiranju kolonija različitih tipova kod sredoziemnog potkovičara. Mehanizmi koji leže u osnovi formiranja

porodiljskih kolonija su najverovatnije korist od grupne termoregulacije i prenos informacija o adekvatnim skloništima i lovnim teritorijama. Još uvek nije najjasnije šta dovodi do formiranja letnjih kolonija mužjaka, ali je moguće da je to takođe razmena informacija o lovnim teritorijama.

Relativno veliki genetički diverzitet je zabeležen u balkanskim populacijama sredoziemnog potkovičara, kako na nuklearnom, tako i na mitohondrijskom nivou. Ove populacije sadrže značajni deo genetičkog diverziteta vrste, i prepoznate su kao najbrojnije i najstabilnije na celom arealu *R. euryale*. Očuvanje balkanskih populacija sredoziemnog potkovičara može imati krucijalni značaj u opstanku ove vrste, zbog čega ih je neophodno zaštititi i uključiti u programe konzervacije.

7. LITERATURA

- Aihartza JR, Garin I, Goiti U, Zabala J, Zuberogoitia I (2003) Spring habitat selection by the Mediterranean horseshoe bat (*Rhinolophus euryale*) in the Urdaibai Biosphere Reserve (Basque Country). *Mammalia* 67 (1): 25-32.
- Allendorf FW, Luikart G (2007) Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing Ltd., Malden, USA. p. 642.
- Altringham JD (2011) Bats: From evolution to conservation. 2nd edition. Oxford University Press, UK. p. 324.
- Altringham JD, Senior P (2005) Social systems and ecology of bats. In: Ruckstuhl KE, Neuhaus P (eds.) Sexual segregation in vertebrates. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 280–302.
- Arrizabalaga-Escudero A, Garin I, García-Mudarra JL, Alberdi A, Aihartza J, Goiti U (2015) Trophic requirements beyond foraging habitats: The importance of prey source habitats in bat conservation. *Biological Conservation* 191: 512–519.
- Avise JC (2000) Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, USA. p. 447.
- Avise JC (2004) Molecular markers, natural history and evolution. Sinauer Associates Inc, Sunderland, USA. p. 655.
- Balasarayanan T, Chezhian P, Kamalakannan R, Yasodha R, Varghese M, Gurumurthi K, Ghosh M (2006) Identification of species-diagnostic ISSR markers for six *Eucalyptus* species. *Silvae Genetica* 55 (1-6): 119–122.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16 (1): 37–48.
- Barova S, Streit A (2018) Action plan for the conservation of all bat species in the European Union 2019-2024. UNEP/EUROBATS.
- Beebee TJC, Rowe G (2008) An introduction to molecular ecology. 2nd edition. Oxford University Press, Oxford, UK. p. 416.
- Benda P, Faizolâhi K, Andreas M, Obuch J, Reiter A, Ševčík M, Uhrin M, Vallo P, Ashrafi S (2012) Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean and Middle East. Part 10. Bat fauna of Iran. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* 76: 163–582.
- Bilgin R, Çoraman E, Karataş A, Morales JC (2009) Phylogeography of the Greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum* (Chiroptera: Rhinolophidae), in Southeastern Europe and Anatolia, with a specific focus on whether the Sea of Marmara is a barrier to gene flow. *Acta Chiropterologica* 11 (1): 53–60.
- Bilgin R, Furman A, Çoraman E, Karataş A (2008) Phylogeography of the Mediterranean horseshoe bat, *Rhinolophus euryale* (Chiroptera: Rhinolophidae), in southeastern Europe and Anatolia. *Acta Chiropterologica*. 10 (1): 41–49.
- Bilgin R, Gürün K, Rebelo H, Puechmaile SJ, Maracı Ö, Presetnik P, Benda P, Hulva P, Ibáñez C, Hamidović D, Fressel N, Horáček I, Karataş A, Karataş A, Allegrini B, Georgiakakis P, Gazaryan S, Nagy ZL, Abi-Said M, Lučan RK, Bartonička T, Nicolaou H, Scaravelli D, Karapandža B, Uhrin M, Paunović M, Juste J (2016) Circum-Mediterranean phylogeography of a bat coupled with past environmental

- niche modeling: A new paradigm for the recolonization of Europe? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 99: 323–336.
- Bogdanowicz W, Piksa K, Tereba A (2012) Genetic structure in three species of whiskered bats (genus *Myotis*) during swarming. *Journal of Mammalogy* 93 (3): 799–807.
- Bonnet E, Van de Peer Y (2002) ZT: A software tool for simple and partial Mantel tests. *Journal of Statistical Software* 7 (10): 1.
- Bornet B, Branchard M (2001) Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant molecular biology reporter* 19 (3):209–215.
- Boston ESM, Roue SG, Montgomery IW, Prodohl PA (2012). Kinship, parentage, and temporal stability in nursery colonies of Leisler's bat (*Nyctalus leisleri*). *Behavioral Ecology* 23 (5): 1015–1021.
- Boston ESM, Montgomery IW, Hynes R, Prodohl PA (2015) New insights on postglacial colonization in western Europe: the phylogeography of the Leisler's bat (*Nyctalus leisleri*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282 (1804): p.20142605.
- Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu C-H, Xie D, Suchard MA, Rambaut A, Drummond AJ (2014) BEAST 2: A software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology* 10: e1003537.
- Brunet-Rossinni AK, Wilkinson GS (2009) Methods for age estimation and the study of senescence in bats. In: Kunz TH, Parsons S (eds.) *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. 2nd edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA. pp. 315–325.
- Budinski I (2013) Prvi pregled faune slepih miševa Ovčarsko-kablarske klisure. *Beležnik Ovčarsko-kablarske klisure* 4 (1): 85–89.
- Budinski I, Karapandža B, Josipović V, Jovanović J, Paunović M (2016) The first record of alpine long-eared bat *Plecotus macrobullaris* in Serbia. *Turkish Journal of Zoology* 40 (6): 984–988.
- Budinski I, Blagojević J, Jovanović VM, Pejić B, Adnađević T, Paunović M, Vujošević M (2019a) Population genetic structure of the Mediterranean horseshoe bat *Rhinolophus euryale* in the central Balkans. *PLoS ONE* 14(1): e0210321.
- Budinski I, Jovanović VM, Pejić B, Blagojević J, Rajičić M, Paunović M, Presetnik P, Vujošević M (2019b) Mitochondrial phylogeography of the Mediterranean horseshoe bat on the Balkan Peninsula. *Archives of Biological Sciences* <https://doi.org/10.2298/ABS190529059B>
- Bugarški-Stanojević V, Blagojević J, Adnađević T, Jovanović V, Vujošević M (2013) Identification of the sibling species *Apodemus sylvaticus* and *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Muridae) – Comparison of molecular methods. *Zoologischer Anzeiger – A Journal of Comparative Zoology* 252 (4): 579–587.
- Bugarški-Stanojević V, Blagojević J, Stamenković G, Adnađević T, Giagia-Athanasopoulou EB, Vujošević M (2011) Comparative study of the phylogenetic

- structure in six *Apodemus* species (Mammalia, Rodentia) inferred from ISSR-PCR data. *Systematics and Biodiversity* 9 (1): 95–106.
- Burgin CJ, Colella JP, Kahn PL, Upham NS (2018) How many species of mammals are there? *Journal of Mammalogy* 99 (1): 1–14.
- Burland TM, Barratt EM, Beaumont MA, Racey PA (1999) Population genetic structure and gene flow in a gleaner bat, *Plecotus auritus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266 (1422): 975–980.
- Burland TM, Barratt EM, Nichols RA, Racey PA (2001) Mating patterns, relatedness and the basis of natal philopatry in the brown long-eared bat, *Plecotus auritus*. *Molecular Ecology* 10 (5): 1309–1321.
- Burland TM, Worthington Wilmer J (2001) Seeing in the dark: molecular approaches to the study of bat populations. *Biological Reviews* 76 (3): 389–409.
- Castella V, Ruedi M, Excoffier L (2001) Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. *Journal of Evolutionary Biology* 14 (5): 708–720.
- Chapuis M-P, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular biology and evolution* 24 (3): 621–631.
- Çoraman E, Furman A, Karataş A, Bilgin R (2013) Phylogeographic analysis of Anatolian bats highlights the importance of the region for preserving the Chiropteran mitochondrial genetic diversity in the Western Palaearctic. *Conservation Genetics* 14 (6): 1205–1216.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9 (8): 772.
- Dietz C, Dietz I, Ivanova T, Siemers BM (2009a). Seasonal and regional scale movements of horseshoe bats (*Rhinolophus*, Chiroptera: Rhinolophidae) in northern Bulgaria. *Nyctalus (NF)* 14: 52–64.
- Dietz C, Nill D, von Helversen O (2009b) *Bats of Britain, Europe and Northwest Africa*. A & C Black Publishers Ltd, London, UK. p. 400.
- Dietz C, Kiefer A (2016) *Bats of Britain and Europe*. Bloomsbury Publishing, London, UK. p. 398.
- Dinale G (1968) Studi sui chiropteri Italiani VII. Sul raggiungimento della maturità sessuale nei Chiropteri europei ed in particolare nei Rhinolophidae. *Archivio Zoologico Italiano* 53: 51–71.
- Dool SE, Puechmaille SJ, Dietz C, Juste J, Ibáñez C, Hulva P, Roué SG, Petit EJ, Jones G, Russo D, Toffoli R, Viglino A, Martinolli A, Rossiter SJ, Teeling EC (2013) Phylogeography and postglacial recolonization of Europe by *Rhinolophus hipposideros*: evidence from multiple genetic markers. *Molecular Ecology* 22 (15): 4055–4070.
- Đurović P (1998) *Speleološki atlas Srbije (Speleological Atlas of Serbia)*. Geografski institut „Jovan Cvijić“ SANU, Beograd, Srbija. p. 290.

- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4 (2): 359–361.
- Eby P (1991) Seasonal movements of grey-headed flying-foxes, *Pteropus poliocephalus* (Chiroptera: Pteropodidae), from two maternity camps in northern New South Wales. *Wildlife Research* 18 (5): 547–559.
- El Mousadik A, Petit RJ (1996). High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and applied genetics* 92 (7): 832–839.
- Estoup A, Jarne P, Cornuet J-M (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11 (9): 1591–1604.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14 (8): 2611–2620.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10 (3): 564–567.
- Fick SE, Hijmans RJ (2017) WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 37 (12): 4302–4315.
- Flanders J, Jones G, Benda P, Dietz C, Zhang S, Li G, Sharifi M, Rossiter SJ (2009) Phylogeography of the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*: contrasting results from mitochondrial and microsatellite data. *Molecular Ecology* 18 (2): 306–318.
- Fleming TH, Eby P (2003) Ecology of bat migration. In: Kunz TH, Fenton MB (eds.) *Bat Ecology*. University of Chicago Press, Chicago, USA. pp. 156–208.
- Frantz AC, Cellina S, Krier A, Schley L, Burke T (2009) Using spatial Bayesian methods to determine the genetic structure of a continuously distributed population: clusters or isolation by distance? *Journal of Applied Ecology* 46 (2): 493–505.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147 (2): 915–925.
- Furman A, Öztunç T, Postawa T, Çoraman E (2010) Shallow genetic differentiation in *Miniopterus schreibersii* (Chiroptera: Vespertilionidae) indicates a relatively recent re-colonization of Europe from a single glacial refugium. *Acta Chiropterologica* 12 (1): 51–59.
- Furmankiewicz J, Altringham J (2007) Genetic structure in a swarming brown long-eared bat (*Plecotus auritus*) population: evidence for mating at swarming sites. *Conservation Genetics* 8 (4): 913–923.
- Geiser F (1998) Evolution of daily torpor and hibernation in birds and mammals: Importance of body size. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 25 (9): 736–40.

- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* 86 (6): 485–486.
- Goudet J (2005) HIERFSTAT, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes* 5 (1): 184–186.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005) GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5 (3): 712–715.
- Hamilton MB (2009) Population genetics. Wiley-Blackwell, Chichester, UK. p. 424.
- Hartl DL, Clark AG (1997) Principles of population genetics, 3rd edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA. p. 569.
- He L, Wang S, Miao X, Wu H, Huang Y (2007) Identification of necrophagous fly species using ISSR and SCAR markers. *Forensic Science International* 168 (2-3): 148–153.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 270 (1512): 313–321.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58 (3): 247–276.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68 (1-2): 87–112.
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359 (1442): 183–195.
- Hewitt GM (2011) Mediterranean peninsulas: The evolution of hotspots. In: Zachos FE, Habel JC (eds.) *Biodiversity Hotspots*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 123–147.
- Heymer A (1964) Résultats du baguage de chauves-souris dans les Pyrénées-orientales de 1945 à 1959. *Vie et Milieu* 15: 765–799.
- Hutterer R, Ivanova T, Meyer-Cords C, Rodrigues L (2005) Bat migrations in Europe: A review of banding data and literature. Federal Agency for Nature Conservation, Bonn, Germany. p. 180.
- Ibáñez C, Novella-Fernandez R, Alonso P, Agirre-Mendi PT (2018) New longevity record for the Mediterranean horseshoe bat (*Rhinolophus euryale* Blasius, 1853). *Journal of Bat Research & Conservation* 11 (1): 80–82.
- Johnson LNL, McLeod BA, Burns LE, Arseneault K, Frasier TR, Broders HG (2015) Population genetic structure within and among seasonal site types in the Little brown bat (*Myotis lucifugus*) and the Northern long-eared bat (*M. septentrionalis*). *PLOS One* 10 (5): e0126309.
- Jost L (2008) G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology* 17 (18): 4015–4026.
- Juste J, Ibáñez C, Muñoz J, Trujillo D, Benda P, Karataş A, Ruedi M (2004) Mitochondrial phylogeography of the long-eared bats (*Plecotus*) in the Mediterranean Palaeartic and Atlantic Islands. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31 (3): 1114–1126.

- Juste J, Alcalde J (2016) *Rhinolophus euryale*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T19516A21971185. Pristupljeno 20 februara 2017.
- Kerth G (2008) Causes and consequences of sociality in bats. *Bioscience* 58 (8): 737–746.
- Kerth G, Mayer F, König B (2000) Mitochondrial DNA (mtDNA) reveals that female Bechstein's bats live in closed societies. *Molecular Ecology* 9 (6): 793–800.
- Kerth G, Safi K, König B (2002) Mean colony relatedness is a poor predictor of colony structure and female philopatry in the communally breeding Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52 (3): 203–210.
- Kerth G, Kiefer A, Trappmann C, Weishaar M (2003) High gene diversity at swarming sites suggest hot spots for gene flow in the endangered Bechstein's bat. *Conservation Genetics* 4 (4): 491–499.
- Kerth G, Petrov B, Conti A, Anastasov D, Weishaar M, Gazaryan S, Jaquiéry J, König B, Perrin N, Bruyndonckx N (2008) Communally breeding Bechstein's bats have a stable social system that is independent from the postglacial history and location of the populations. *Molecular Ecology* 17 (10): 2368–2381.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16 (2) 111–120.
- Kunz TH, Lumsden LF (2003) Ecology of cavity and foliage roosting bats. In: Kunz TH, Fenton MB (eds.). *Bat ecology*. The University of Chicago Press, Chicago, USA. pp. 3–89.
- Maltagliati F, Lai T, Casu M, Valdesalici S, Castelli A (2006) Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Biochemical Systematics and Ecology* 34 (8): 626–634.
- McKechnie AE, Mzilikazi N (2011) Heterothermy in Afrotropical mammals and birds: a review. *Integrative and comparative biology* 51(3): 349–63.
- Meirmans PG, Hedrick PW (2011) Assessing population structure: FST and related measures. *Molecular Ecology Resources* 11 (1): 5–18.
- Moussy C, Hosken DJ, Mathews F, Smith GC, Aegerter JN, Bearhop S (2013) Migration and dispersal patterns of bats and their influence on genetic structure. *Mammal Review* 43 (3): 183–195.
- Najafi N, Akmal V, Sharifi M (2019) Historical explanation of genetic variation in the Mediterranean horseshoe bat *Rhinolophus euryale* (Chiroptera: Rhinolophidae) inferred from mitochondrial cytochrome-b and D-loop genes in Iran. *Mitochondrial DNA. Part A, mapping, sequencing and analysis* 30 (1): 135–147.
- Nei M (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of human genetics* 41 (2): 225–233.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia university press, New York, USA. p. 512.
- Neuweiler G (1993) *Biologie der Fledermäuse*. Thieme-Verlag, Stuttgart, Germany. p. 350.

- Norberg UM, Rayner JMV (1987) Ecological morphology and flight in bats (Mammalia; Chiroptera): wing adaptations, flight performance, foraging strategy and echolocation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 316 (1179): 335–427.
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O’Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H (2017) *vegan: Community Ecology Package version 2.4-5*. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Paunović M (2016) Rasprostranjenje, ekologija i centri diverziteta slepih miševa (Mammalia, Chiroptera) u Srbiji. Doktorska disertacija. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Paunović M, Budinski I, Karapandža B, Pejić B (2018) Ranjena pećina cave - a new important roost site of Mehely’s horseshoe bat *Rhinolophus mehelyi* in Serbia. Regional symposium “Conservation status of bats in the Central Europe and Western Balkan”, 31.5-1.6.2018, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina. Book of abstracts p. 25.
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28 (19): 2537–2539.
- Pejić B, Budinski I, Paunović M, Karapandža B, Josipović J (2018) Sredozemni potkovičar. In: Stanković D, Paunović M, Raković M (eds.) Atlas migratornih ptica i slepih miševa Srbije. Ministarstvo zaštite životne sredine Republike Srbije, Ministarstvo kulture i informisanja Republike Srbije, Prirodnjački muzej u Beogradu. Posebna izdanja, knjiga 46. pp. 477-479.
- Petit E, Excoffier L, Mayer F (1999) No evidence of bottleneck in the postglacial recolonization of Europe by the Noctule bat (*Nyctalus noctula*). *Evolution* 53 (4): 1247–1258.
- Prešetik P, Mulaomerović J, Pašić J, Napotnik I, Milanolo S, Budinski I, Pejić B (2016) Rezultati pregleda potencijalnih zimskih skloništa u Bosni i Hercegovini u zimu 2015/16 [Survey results of potential bat hibernacula in Bosnia and Herzegovina in winter 2015/16]. *Hypsugo* 1 (2): 34–48.
- Pretzlaff I, Kerth G, Dausmann KH (2010) Communally breeding bats use physiological and behavioural adjustments to optimise daily energy expenditure. *Naturwissenschaften* 97 (4): 353–363.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 (2): 945–959.
- Provan J, Bennett K (2008) Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in Ecology & Evolution* 23 (10): 564–571.
- Puechmaille SJ (2016) The program STRUCTURE does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators alleviate the problem. *Molecular Ecology Resources* 16 (3): 608–627.
- Puechmaille S, Mathy G, Petit E (2005). Characterization of 14 polymorphic microsatellite loci for the lesser horseshoe bat, *Rhinolophus hipposideros* (Rhinolophidae, Chiroptera). *Molecular Ecology Notes* 5 (4): 941–944.

- Puechmaille SJ, Gouilh MA, Piyapan P, Yokubol M, Mie KM, Bates PJ, Satasook C, Nwe T, Bu SS, Mackie IJ, Petit EJ (2011). The evolution of sensory divergence in the context of limited gene flow in the bumblebee bat. *Nature Communications* 2: 253.
- Puechmaille SJ, Borissov IM, Zsebok S, Allegrini B, Hizem M, Kuenzel S, Schuchmann M, Teeling EC, Siemers BM (2014). Female mate choice can drive the evolution of high frequency echolocation in bats: a case study with *Rhinolophus mehelyi*. *PLOS One* 9 (7): e103452.
- Puechmaille SJ, Teeling EC (2014). Non-invasive genetics can help find rare species: a case study with *Rhinolophus mehelyi* and *R. euryale* (Rhinolophidae: Chiroptera) in Western Europe. *Mammalia* 78 (2): 251–255.
- Queller DC, Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43 (2): 258–275.
- Racey PA (2009). Reproductive assessment of bats. Ecological and behavioral methods for the study of bats. 2nd edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA. pp. 249–264.
- Rajaei Sh H, Rödder D, Weigand AM, Dambach J, Raupach MJ, Wägele JW (2013) Quaternary refugia in southwestern Iran: insights from two sympatric moth species (Insecta, Lepidoptera). *Organisms Diversity & Evolution* 13 (3): 409–423.
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67 (5): 901–904.
- Randi E (2007) Phylogeography of South European mammals. In: Weiss S, Ferrand N (eds.) *Phylogeography of southern European refugia*. Springer, Dordrecht, Netherlands. pp. 101–126.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86 (3): 248–249.
- Razgour O, Juste J, Ibáñez C, Kiefer A, Rebelo H, Puechmaille SJ, Arlettaz R, Burke T, Dawson DA, Beaumont M, Jones G (2013). The shaping of genetic variation in edge-of-range populations under past and future climate change. *Ecology Letters* 16 (10): 1258–1266.
- Rebelo H, Froufe E, Brito JC, Russo D, Cistrone L, Ferrand N, Jones G (2012) Postglacial colonization of Europe by the barbastelle bat: agreement between molecular data and past predictive modelling. *Molecular Ecology* 21 (11): 2761–2774.
- Rivers NM, Butlin RK, Altringham JD (2005) Genetic population structure of Natterer's bats explained by mating at swarming sites and philopatry. *Molecular Ecology* 14 (14): 4299–4312.
- Roer H (1995): 60 years of bat-banding in Europe - results and tasks for future research. *Myotis* 32-33: 251–261.
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9 (3): 552–569.

- Rossiter SJ, Jones G, Ransome RD, Barratt EM (2002) Relatedness structure and kin-biased foraging in the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 51 (6): 510–518.
- Rossiter SJ, Benda P, Dietz C, Zhang S, Jones G (2007) Rangewide phylogeography in the greater horseshoe bat inferred from microsatellites: implications for population history, taxonomy and conservation. *Molecular Ecology* 16 (22): 4699–4714.
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-García A (2017) DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution* 34 (12): 3299–3302.
- Ruedi M, Walter S, Fischer MC, Scaravelli D, Excoffier L, Heckel G (2008). Italy as a major Ice Age refuge area for the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae) in Europe. *Molecular Ecology* 17 (7): 1801–1814.
- Russo D, Jones G (2002) Identification of twenty-two bat species (Mammalia: Chiroptera) from Italy by analysis of time-expanded recordings of echolocation calls. *Journal of Zoology* 258 (1): 91–103.
- Russo D, Jones G, Migliozzi A (2002). Habitat selection by the Mediterranean horseshoe bat, *Rhinolophus euryale* (Chiroptera: Rhinolophidae) in a rural area of southern Italy and implications for conservation. *Biological Conservation* 107 (1): 71–81.
- Safi K, Kerth G (2007) Comparative analyses suggest that information transfer promoted sociality in male bats in the temperate zone. *The American Naturalist* 170 (3): 465–472.
- Schober W, Grimmberger E (1989) A guide to BATS of Britain and Europe. The Hamlyn Publishing Group Limited, London, England. pp. 224.
- Shackleton JC, Andel TH van, Runnels CN (1984). Coastal paleogeography of the Central and Western Mediterranean during the last 125,000 years and its archaeological implications. *Journal of Field Archaeology* 11 (3): 307–314.
- Simmons NB (2005a). An Eocene Big Bang for Bats. *Science* 307 (5709): 527–528.
- Simmons NB (2005b) Order Chiroptera. In: Wilson DE, Reeder DM (eds.) *Mammal species of the World: A taxonomic and geographic reference*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA. pp. 312–529.
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139 (1): 457–462.
- StatSoft Inc (1997) *Statistica for Windows*. Computer Program Manual, Tulsa, OK, USA.
- Strauss WM (2001) Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2: Unit2.2.
- Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution* 15 (5): 199–203.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy A-G, Cosson J-F (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7 (4): 453–464.

- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123 (3): 585–595.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30 (12): 2725–2729.
- Théou P, Bego F (2018) Bats of Albania. p. 123.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* 22 (22): 4673–4680.
- Tobe SS, Kitchener AC, Linacre AMT (2010) Reconstructing mammalian phylogenies: A detailed comparison of the Cytochrome b and Cytochrome Oxidase Subunit I mitochondrial genes. *PLOS One* 5 (11): e14156.
- Uhrin M, Danko Š, Obuch J, Horáček I, Pačenovský S, Pjenčák P, Fulín M (1996) Distributional patterns of bats (Mammalia: Chiroptera) in Slovakia. Part 1, horseshoe bats (Rhinolophidae). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* 60: 247–279.
- Uhrin M, Boldogh S, Bücs S, Paunovic M, Mikova E, Juhász M, Csösz I, Estók P, Fulín M, Gombkötő P, Jéré C (2012) Revision of the occurrence of *Rhinolophus euryale* in the Carpathian region, Central Europe. *Vespertilio* 16: 289–328.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4 (3): 535–538.
- Wan Q-H, Wu H, Fujihara T, Fang S-G (2004). Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis* 25 (14): 2165–2176.
- Wang J (2011) COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* 11 (1): 141–145.
- Webb T, Bartlein PJ (1992) Global changes during the last 3 million years: climatic controls and biotic responses. *Annual review of ecology and systematics* 23 (1): 141–173.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38 (6): 1358.
- Wilkinson GS (1992) Information transfer at evening bat colonies. *Animal Behaviour* 44 (1): 501–518.
- Wilson GA, Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163 (3): 1177–1191.
- Worthington Wilmer J, Barratt EM (1996). A non-lethal method of tissue sampling for genetic studies of chiropterans. *Bat Research News* 37: 1–3.
- Wright S (1943). Isolation by distance. *Genetics* 28 (2): 114–138.

Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of eugenics* 15 (4): 323–354.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20 (2): 176–183.

8. PRILOZI

Prilog 1. Spisak dozvola za istraživanje slepih miševa u Srbiji, Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori i Sloveniji koje su izdate od strane nadležnih institucija.

SRBIJA

Broj dozvole: 353-01-3031/2012-03, izdata od strane Ministarstva životne sredine, rudarstva i prostornog planiranja Republike Srbije.

Broj dozvole: 353-01-685/2013-08, izdata od strane Ministarstva energetike, razvoja i zaštite životne sredine Republike Srbije.

Broj dozvole: 353-01-2660/2013-08, izdata od strane Ministarstva energetike, razvoja i zaštite životne sredine Republike Srbije

Broj dozvole: 353-01-1994/2014-17, izdata od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije.

Broj dozvole: 353-01-2503/2015-17, izdata od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije.

Broj dozvole: 353-01-2671/2016-17, izdata od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije.

Broj dozvole: 353-01-2673/2016-17, izdata od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije.

BOSNA I HERCEGOVINA

Broj dozvole: 08-3-28-2225-5/16, izdata od strane Ministarstva vanjske trgovine i ekonomskih odnosa Bosne i Hercegovine.

CRNA GORA

Broj dozvole: 02-UPI-959/4, izdata od strane Agencije za zaštitu životne sredine Crne Gore

SLOVENIJA

Broj dozvole: ARSO 35601-35/2010-6, izdata od strane Agencije Republike Slovenije za okolje, Ministarstvo za okolje in prostor Republike Slovenije.

Prilog 2. Spisak lokaliteta na kojima su hvatani slepi miševi sa datumima kada je lokalitet posećen i brojem jedinki ove vrste uhvaćenih prilikom svake posete.

Država	Lokalitet	Datum	Broj uhvaćenih jedinki	
SRBIJA	Bela sala	18-19.6.2012.	21	
		3.10.2014.	21	
		10.5.2016.	1	
		28.5.2017.	3	
		5.10.2017.	8	
	Canetova pećina	24.4.2013.	19	
		23.4.2016.	11	
	Ćebića pećina	4.4.2014.	5	
	Drenajička pećina	18.9.2014.	10	
		19.9.2017.	3	
	Držinska pećina	15.5.2013.	41	
	Hadži-Prodanova pećina	17.9.2016.	2	
	Lazareva pećina	24.3.2012.	1	
		15- 17.10.2012.	5	
			9.3.2013.	22
			16.9.2016.	1
	Ljubinkova pećina	3.8.2013.	35	
	Ogorelička pećina	15.9.2016.	13	
	Pećurski kamen	5.9.2015.	19	
	Petnička pećina	1-2.8.2012.	12	
		13.6.2013.	5	
		5.7.2013.	11	
		7.9.2013.	7	
		26.10.2013.	3	
		8.6.2014.	5	
		5.6.2015.	1	
	27.6.2015.	1		

			30.8.2015.	18
			5.3.2016.	10
			2.4.2016.	3
			23.3.2017.	1
			22.6.2017.	6
			15.9.2017.	2
	Temska		13.5.2013.	24
			24.7.2015.	12
	Tmuša		15.6.2013.	11
			10.6.2014.	5
			13.7.2015.	15
			18.9.2016.	1
	Tomina pećina		17.9.2015.	1
	Toplik		17.9.2015.	1
			10.10.2017.	2
<hr/>				
BOSNA	I	Kamenolom	u 16.2.2016.	3
HERCEGOVINA		Dardaganima		
<hr/>				
CRNA GORA		Začirska pećina	14.9.2013.	12
<hr/>				

Prilog 3. Računanje parametra MaxMeaK koristeći graničnu vrednost od 0.5 za srednju vrednost koeficijenta pripadnosti nekom klasteru.

K=2	2
K=2	2
K=2	1
K=2	2
K=2	2
K=2	2
K=2	2
K=2	2
K=2	2
K=2	2
Median	Max
2	2

K=3	2
K=3	3
K=3	3
K=3	3
K=3	3
K=3	3
K=3	3
K=3	1
K=3	3
K=3	3
Median	Max
3	3

K=4	3
K=4	2
K=4	1
K=4	3
K=4	1
K=4	3
K=4	2
K=4	1
K=4	3
K=4	3
Median	Max
2.5	3

K=5	1
K=5	1
K=5	1
K=5	2
K=5	2
K=5	1
K=5	1
K=5	1
K=5	2
K=5	3
Median	Max
1	3

K=6	1
K=6	1
K=6	2
K=6	1
K=6	1
K=6	2
K=6	1
K=6	1
K=6	2
K=6	2
Median	Max
1	2

K=7	1
K=7	2
K=7	1
K=7	1
K=7	1
K=7	1
K=7	1
K=7	1
K=7	1
K=7	1
Median	Max
1	2

K=8	1
K=8	1
K=8	1
K=8	1
K=8	1
K=8	1
K=8	1
K=8	1
K=8	1
K=8	1
Median	Max
1	1

1 Kada su sve vrednosti bile manje od 0.5

Računanje je rađeno samo do $K = 8$ jer su nadalje sve dobijene vrednosti za broj klastera bile = 1)

MaxMeaK 3

Prilog 4. Računanje parametra koristeći graničnu vrednost od 0.5 za srednju vrednost koeficijenta pripadnosti nekom klasteru.

K=2	2
K=2	2
K=2	1
K=2	2
K=2	2
K=2	2
K=2	2
K=2	2
K=2	2
K=2	2
K=2	2
Median	Max
2	2

K=3	2
K=3	3
K=3	3
K=3	3
K=3	3
K=3	3
K=3	3
K=3	1
K=3	3
K=3	3
Median	Max
3	3

K=4	3
K=4	2
K=4	1
K=4	3
K=4	1
K=4	2
K=4	2
K=4	1
K=4	1
K=4	3
K=4	3
Median	Max
2	3

K=5	1
K=5	1
K=5	1
K=5	2
K=5	2
K=5	1
K=5	1
K=5	1
K=5	2
K=5	2
K=5	3
Median	Max
1	3

K=6	1
K=6	1
K=6	2
K=6	1
K=6	1
K=6	2
K=6	1
K=6	1
K=6	2
K=6	2
Median	Max
1	2

K=7	1
K=7	2
K=7	1
K=7	1
K=7	1
K=7	1
K=7	1
K=7	1
K=7	1
K=7	1
K=7	1
Median	Max
1	2

K=8	1
K=8	1
K=8	1
K=8	1
K=8	1
K=8	1
K=8	1
K=8	1
K=8	1
K=8	1
K=8	1
Median	Max
1	1

1 Kada su sve vrednosti bile manje od 0.5

Računanje je rađeno samo do $K = 8$ jer su nadalje sve dobijene vrednosti za broj klastera bile = 1)

MaxMeaK 3

Prilog 5. G''_{ST} vrednosti (ispod dijagonale) i p vrednosti za značajnost genetičke diferencijacije (iznad dijagonale) između parova populacija.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		0.337	0.240	0.029	0.667	0.543	0.199	0.002	0.001	0.002	0.957	0.001
2	0.009		0.442	0.639	0.664	0.689	0.389	0.003	0.045	0.123	0.162	0.003
3	0.014	0.001		0.470	0.354	0.672	0.404	0.002	0.072	0.067	0.161	0.002
4	0.057	-0.012	0.000		0.035	0.728	0.180	0.001	0.015	0.068	0.279	0.005
5	-0.014	-0.017	0.006	0.052		0.499	0.385	0.003	0.012	0.051	0.302	0.007
6	-0.007	-0.015	-0.011	-0.015	-0.001		0.853	0.003	0.003	0.029	0.614	0.001
7	0.019	0.003	0.002	0.016	0.004	-0.019		0.006	0.011	0.033	0.116	0.001
8	0.132	0.098	0.090	0.095	0.112	0.091	0.068		0.517	0.049	0.018	0.002
9	0.153	0.060	0.040	0.076	0.087	0.103	0.066	-0.006		0.334	0.010	0.001
10	0.163	0.051	0.062	0.075	0.084	0.096	0.070	0.077	0.013		0.005	0.004
11	-0.052	0.037	0.033	0.019	0.018	-0.014	0.036	0.091	0.112	0.214		0.011
12	0.151	0.127	0.112	0.106	0.125	0.128	0.162	0.144	0.175	0.199	0.143	

Podebljane vrednosti predstavljaju stepen diferencijacije između populacija koji je statistički značajno veći od očekivanog stepena između dve nasumične populacije. Brojevi populacija odgovaraju brojevima datim u Tabeli 2. Nijansama sive boje je predstavljena međusobna geografska udaljenost lokaliteta □ 0-150 km, ■ 151-300 km, ■ 301-450 km i ■ > 450 km.

Prilog 6. Jost D vrednosti (ispod dijagonale) i p vrednosti za značajnost genetičke diferencijacije (iznad dijagonale) između parova populacija.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		0.336	0.241	0.029	0.667	0.543	0.199	0.002	0.001	0.001	0.957	0.001
2	0.007		0.442	0.639	0.664	0.689	0.389	0.003	0.045	0.122	0.162	0.002
3	0.010	0.001		0.470	0.354	0.672	0.404	0.002	0.075	0.069	0.161	0.002
4	0.044	-0.009	0.000		0.036	0.728	0.179	0.001	0.016	0.068	0.278	0.005
5	-0.011	-0.012	0.004	0.040		0.499	0.385	0.003	0.012	0.052	0.302	0.007
6	-0.005	-0.011	-0.008	-0.011	0.000		0.854	0.003	0.003	0.030	0.615	0.001
7	0.014	0.002	0.001	0.012	0.003	-0.015		0.006	0.011	0.031	0.115	0.001
8	0.102	0.074	0.069	0.073	0.086	0.070	0.052		0.517	0.049	0.018	0.002
9	0.119	0.045	0.030	0.058	0.066	0.079	0.050	-0.005		0.334	0.010	0.001
10	0.126	0.038	0.047	0.057	0.063	0.073	0.052	0.058	0.010		0.005	0.004
11	-0.039	0.028	0.025	0.014	0.014	-0.011	0.028	0.070	0.086	0.168		0.011
12	0.119	0.099	0.088	0.083	0.097	0.100	0.127	0.113	0.137	0.156	0.113	

Podobljane vrednosti predstavljaju stepen diferencijacije između populacija koji je statistički značajno veći od očekivanog stepena između dve nasumične populacije. Brojevi populacija odgovaraju brojevima datim u Tabeli 2. Nijansama sive boje je predstavljena međusobna geografska udaljenost lokaliteta □ 0-150 km, ■ 151-300 km, ■ 301-450 km i ■ > 450 km.

Biografija

Ivana Budinski je rođena 10.08.1987. u Vrbasu. Osnovnu školu i gimnaziju je završila u Ruskom Krsturu. Osnovne studije biologije upisala je 2006. godine na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, a master studije biologije (modul zoologija) upisala je 2010. na istom fakultetu. Doktorske studije biologije (modul evolucionarna biologija) upisala je školske 2011/2012. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od novembra 2011. godine zaposlena je na Odeljenju za genetička istraživanja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu, na projektu osnovnih istraživanja br. 173003 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Zvanje istraživač saradnik je stekla u februaru 2014. godine. Spoljašnji je saradnik Prirodnjačkog muzeja i Centra za markiranje životinja u Beogradu.

U periodu 2012-2015 je bila učesnik u projektima za popularizaciju nauke Evropske komisije *SCIMFONICOM* (FP7-PEOPLE-2012-NIGHT – 316471; HORIZON 2020, MSCA-NIGHT-2014 – 633376), a 2016-2017. godine je učestvovala kao organizator u okviru projekta *ReFocus* (H2020-MSCA-NIGHT-2016-ReFocusS-722341). Od 2011. godine učestvuje u organizaciji manifestacije „Međunarodna noć slepih miševa“ u Beogradu. Od 2011. godine je stručni saradnik na seminarima biologije u Istraživačkoj stanici Petnica.

2016. godine je preko programa mobilnosti Erasmus+ provela 5 meseci u grupi za primenjenu ekologiju na Univerzitetu Federico II u Napulju (Italija), a 2019. godine je preko programa Eurodiseja provela 6 meseci u grupi za istraživanje slepih miševa u Prirodnjačkom muzeju u Granoljersu (Španija).

Autor je ili koautor 22 naučna rada, od kojih je osam publikovano u vrhunskim međunarodnim časopisima. Učestvovala je na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima sa 31 kongresnih saopštenja. Dobitnik je nagrade za najbolju studentsku poster prezentaciju na “XIV European Bat Research Symposium” u avgustu 2017. godine. Član je Društva genetičara Srbije

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ивана В. Будински

Број индекса Б3022/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Генетичка структура популација средоземног потковичара *Rhinolophus euryale* Blasius, 1853 у Србији и филогеографија ове врсте на Балканском полуострву“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 31.10.2019.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ивана В. Будински

Број индекса Б3022/2011

Студијски програм Биологија, модул Еволуциона биологија

Наслов рада „Генетичка структура популација средоземног потковичара *Rhinolophus euryale* Blasius, 1853 у Србији и филогеографија ове врсте на Балканском полуострву“

Ментори: др Младен Вујошевић, научни саветник у пензији Универзитета у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

др Драгана Цветковић, ванредни професор Универзитета у Београду, Биолошки факултет

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 31.10.2019.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Генетичка структура популација средоземног потковичара *Rhinolophus euryale* Blasius, 1853 у Србији и филогеографија ове врсте на Балканском полуострву“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 31.10.2019.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.