

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA
MORFOLOŠKA VARIABILNOST IN IDENTIFIKACIJA
POGOSTIH VRST KOMARJEV (DIPTERA:
CULICIDAE) V SLOVENIJI

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Morfološka variabilnost in identifikacija pogostih vrst
komarjev (Diptera: Culicidae) v Sloveniji**

(Morphological variability and identification of common mosquito species
(Diptera: Culicidae) in Slovenia)

Ime in priimek: Aja Golob
Študijski program: Biodiverziteteta
Mentor: doc. dr. Jure Jugovic
Somentor: asist. Katja Kalan

Koper, september 2018

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Aja GOLOB

Naslov zaključne naloge: Morfološka variabilnost in identifikacija pogostih vrst komarjev (Diptera: Culicidae) v Sloveniji

Kraj: Koper

Leto: 2018

Število listov: 39

Število slik: 18

Število tabel: 10

Število prilog: 2

Št. strani prilog: 6

Število referenc: 49

Mentor: doc. dr. Jure Jugovic

Somentor: asist. Katja Kalan

Ključne besede: komarji, Culicidae, geometrijska morfometrija, morfološka variabilnost

Izvleček:

Preverjali smo uporabnost morfološke metode geometrijske morfometrije pri prepoznavi taksonov komarjev in analizirali morfološko variabilnost kril devetih vrst komarjev v Sloveniji, od tega sedem avtohtonih in dveh tujerodnih. Živalim smo odstranili levo krilo ter na netrajnih preparatih pod lupo na merilcu označevali 17 točno določenih točk (angl. *landmarks* - LM). Analizirali smo medrodovno in medvrstno variabilnost velikosti in oblike kril. Z rezultati smo dokazali, da so krila taksonov različno velika in izkazujejo različno stopnjo variabilnosti, prav tako pa smo dokazali, da je geometrijska morfometrija uporabna za prepoznavanje pogostih vrst komarjev v Sloveniji na morfološki osnovi.

Key words documentation

Name and SURNAME: Aja GOLOB

Title of the final project paper: Morphological variability and identification of common mosquito species (Diptera: Culicidae) in Slovenia

Place: Koper

Year: 2018

Number of pages: 39

Number of figures: 18

Number of tables: 10

Number of appendix: 2

Number of appendix pages: 6

Number of references: 49

Mentor: Assist. Prof. Jure Jugovic, PhD

Co-Mentor: Assist. Katja Kalan

Keywords: mosquitoes, Culicidae, geometric morphometrics, morphological variability

Abstract:

We tested the use of advanced method of geometric morphometrics for the analysis of morphological variability of nine Slovenian mosquito species, seven autochthonous and two invasive. We removed the left wing, made non-permanent mounts and marked 17 specific landmarks (LM) under a stereomicroscope. We analysed intragenus and intraspecific variability in size and shape of the wings. The results showed that analyzed mosquito species are different in wing size and they express different levels of variability. We assessed that geometric morphometrics is a reliable tool for mosquito species recognition on a morphological basis.

ZAHVALA

Doc. dr. Juretu Jugovicu se iskreno zahvaljujem za njegovo mentorstvo, vsestransko pomoč in nasvete pri izdelavi zaključne naloge. Prav tako se zahvaljujem somentorici asist. Katji Kalan za izjemno somentorstvo, zaupanje vzorcev komarjev in znanja, ki mi ga je posredovala.

Hvala tudi Famnitu za prispevanje sredstev in možnost izdelave zaključne naloge.

Zahvaljujem se družini in prijateljem, ki so mi ves čas stali ob strani in pomagali na tej študijski poti, posebna zahvala pa gre kolegicama Niki Šumer in Marjanci Tomažič za nenehno vzpodbudo in deljenje misli.

Predvsem hvala mentorju in somentorici za možnost sodelovanja in zaupanja pri projektu. Brez tako odličnega mentorstva zaključna naloga ne bi bila to, kar je.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Pregled objav.....	2
1.1.1	Diverziteteta komarjev	2
1.1.1.1	Taksonomski pregled	2
1.1.1.2	Komarji v Evropi.....	3
1.1.1.3	Komarji v Sloveniji	4
1.1.2	Filogenija komarjev.....	4
1.1.2.1	Ocena divergenc.....	5
1.1.3	Tradicionalne metode prepoznavanja komarjev	7
1.1.3.1	Morfološki znaki	7
1.1.3.2	Morfološka variabilnost	8
1.1.3.3	Genetska variabilnost	9
1.1.4	Napredne morfološke metode	10
1.1.4.1	Geometrijska morfometrija	10
1.1.4.2	Molekulske metode	11
2	MATERIALI IN METODE	12
2.1	Seznam vrst	12
2.2	Priprava živali	13
2.3	Meritve	13
2.4	Obdelava podatkov in statistična analiza	14
3	REZULTATI IN DISKUSIJA	16
3.1	Rezultati	16
3.1.1	Velikost	16
3.1.2	Oblika.....	17
3.1.2.1	Znotraj in medrodovna variabilnost	17
3.1.2.2	Znotrajrodovna variabilnost in medvrstne razlike	25
3.1.2.2.1	Rod <i>Aedes</i>	25
3.1.2.2.2	Rod <i>Culex</i>	29
3.2	Diskusija.....	31
3.2.1	Morfološka variabilnost na ravni rodov	31
3.2.2	Morfološka variabilnost na ravni vrst	33
4	ZAKLJUČEK.....	34
5	LITERATURA IN VIRI	35

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Seznam vrst z mesecem in letom ter lokacijo vzorčenj.	12
Preglednica 2. Število osebkov (N), srednja vrednost velikosti centroida (mediana in povprečje), 95 % intervalom zaupanja za povprečje (95 % CI), standardno deviacijo (SD) in koeficientom variabilnosti (CV).....	17
Preglednica 3. Rezultati analize glavnih komponent za vseh 6 rodov; seznam prvih osmih funkcij (PC) z lastnimi vrednostmi, odstotki pojasnjene variance in kumulativni odstotki.	17
Preglednica 4. Rezultati diskriminacijske analize za vseh 6 rodov; seznam vseh diskriminacijskih funkcij (DF) z lastnimi vrednostmi, odstotki pojasnjene variance, kumulativni odstotki in signifikanco.....	18
Preglednica 5. Mahalanobisove razdalje med pari rodov pogostih vrst komarjev v Sloveniji ter povprečna oddaljenost vsakega rodu od vseh ostalih.....	24
Preglednica 6. Rezultati analize glavnih komponent za tri vrste znotraj rodu <i>Aedes</i> ; seznam prvih osmih funkcij (PC) z lastnimi vrednostmi, odstotki pojasnjene variance in kumulativni odstotki.....	26
Preglednica 7. Rezultati diskriminacijske analize za vse tri vrste rodu <i>Aedes</i> ; seznam vseh diskriminacijskih funkcij (DF) z lastnimi vrednostmi, odstotki pojasnjene variance, kumulativni odstotki in signifikanco.....	26
Preglednica 8. Mahalanobisove razdalje med pari treh vrst iz rodu <i>Aedes</i>	28
Preglednica 9. Rezultati analize glavnih komponent za dve vrsti rodu <i>Culex</i> ; seznam prvih šestih funkcij (PC) z lastnimi vrednostmi, odstotki pojasnjene variance in kumulativni odstotki.	29
Preglednica 10. Rezultati diskriminacijske analize s statistično pomembnimi LM in njihovimi prispevki.	30

KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1. Filogenetsko drevo komarjev (povzeto po Reidenbach in sod. 2009).	6
Slika 2. Variabilnost velikosti pri komarjih; levo zgoraj - <i>Anopheles</i> , desno zgoraj - <i>Wyeomyia</i> , levo spodaj - <i>Coquillettidia</i> , desno spodaj - <i>Toxorhynchites</i> (UTEP, Slide 5).....	8
Slika 3. Uporabljeni LM z merilom (vrsta: <i>Culiseta annulata</i>) (Foto: Aja Golob).....	13
Slika 4. Srednja vrednost velikosti centroida (CS); (a) na nivoju rodov (<i>Genus</i>), (b) na nivoju vrst (<i>Species</i>).	16
Slika 5. Projekcija komarjev iz šestih rodov vzdolž prvih dveh primarnih komponent (<i>Principal component</i>) ob upoštevanju koordinat za 17 LM.	18
Slika 6. Projekcija komarjev iz šestih rodov vzdolž prvih štirih diskriminacijskih osi (<i>Canonical variate</i>) ob upoštevanju koordinat za 17 LM.	19
Slika 7. Variabilnost oblike prikazana z wireframe grafi za prvo komponento diskriminacijske analize (CV1) za vseh šest rodov (črna - <i>Aedes</i> + <i>Culex</i> , rumena - <i>Anopheles</i> , zelena - <i>Coquillettidia</i> , modra - <i>Culiseta</i> , roza - <i>Ochlerotatus</i>).	20
Slika 8. Variabilnost oblike prikazana z wireframe grafi za drugo komponento diskriminacijske analize (CV2) za vseh šest rodov (črna - <i>Aedes</i> + <i>Culex</i> , rumena - <i>Anopheles</i> , zelena - <i>Coquillettidia</i> , modra - <i>Culiseta</i> , roza - <i>Ochlerotatus</i>).	21
Slika 9. Variabilnost oblike prikazana z wireframe grafi za tretjo komponento diskriminacijske analize (CV3) za vseh šest rodov (črna - <i>Aedes</i> + <i>Culex</i> , rumena - <i>Anopheles</i> , zelena - <i>Coquillettidia</i> , modra - <i>Culiseta</i> , roza - <i>Ochlerotatus</i>).	22
Slika 10. Variabilnost oblike prikazana z wireframe grafi za četrto komponento diskriminacijske analize (CV4) za vseh šest rodov (črna - <i>Aedes</i> + <i>Culex</i> , rumena - <i>Anopheles</i> , zelena - <i>Coquillettidia</i> , modra - <i>Culiseta</i> , roza - <i>Ochlerotatus</i>).	23
Slika 11. Analiza kopičenja za šest pogostih vrst komarjev v Sloveniji z Wardovo metodo. Uporabljenih je bilo 17 LM.....	25
Slika 12. Projekcija treh vrst komarjev iz rodu <i>Aedes</i> vzdolž prvih dveh primarnih komponent (<i>Principal component</i>) ob upoštevanju koordinat za 17 LM.	26
Slika 13. Projekcija treh vrst komarjev iz rodu <i>Aedes</i> vzdolž prvih dveh diskriminacijskih osi (<i>Canonical variate</i>) ob upoštevanju koordinat za 17 LM.	27
Slika 14. Variabilnost oblike prikazana z wireframe grafi za prvo komponento diskriminacijske analize (CV1) za vse tri vrste rodu <i>Aedes</i> (rdeča = <i>Ae. albopictus</i> , zelena = <i>Ae. geniculatus</i> , modra = <i>Ae. japonicus</i>).	27
Slika 15. Variabilnost oblike prikazana z wireframe grafi za drugo komponento diskriminacijske analize (CV2) za vse tri vrste rodu <i>Aedes</i> (rdeča = <i>Ae. albopictus</i> , zelena = <i>Ae. geniculatus</i> , modra = <i>Ae. japonicus</i>).	28
Slika 16. Projekcija dveh vrst komarjev iz rodu <i>Culex</i> vzdolž prvih dveh primarnih komponent (<i>Principal component</i>) ob upoštevanju koordinat za 17 LM.	29

Slika 17. Diskriminacijska analiza dveh vrst rodu *Culex* (rdeča = *Cx. hortensis*, modra = *Cx. pipiens*)..... 30

Slika 18. Variabilnost oblike prikazana z wireframe grafom za prvo komponento diskriminacijske analize (CV1) za dve vrsti rodu *Culex* (rdeča = *Cx. hortensis*, modra = *Cx. pipiens*). 31

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Enosmerna analiza variance za 17 LM in velikost centroida (CS) pri šestih rodovih pogostih komarjev v Sloveniji (signifikanca = 0,001).

PRILOGA B: Games-Howel in Post-hoc test med rodovi; standardna napaka (SE), statistična značilnost (Sig.) (prikazane le $p < 0,005$).

SEZNAM KRATIC

LM (*Landmarks*) = točke

Ma = milijon let nazaj

CS (*Centroid size*) = velikost centroida

PCA (*Principal Component Analysis*) = analiza glavnih komponent

DNK = deoksiribonukleinska kislina

CVA (*Canonical Variate Analysis*) = diskriminacijska analiza

CV (*Coefficient of Variation*) = koeficient variabilnosti

N = število osebkov

CI (*Confidential Interval*) = interval zaupanja

SD (*Standard Deviation*) = standardna deviacija

PC = funkcija analize glavnih komponent

DC = diskriminacijska funkcija

1 UVOD

Vpliv komarjev na življenje ljudi je nedvoumno velik. V zadnjih 100 letih se raziskovalci redno ukvarjajo z njihovim nadzorom in preučevanjem prenosljivih bolezni, katerih vektorji so komarji. V tropskih državah komarji že od nekdaj predstavljajo problem, zaradi ekspanzivnosti in izredne prilagodljivosti pa se hitro širijo tudi v druge dele sveta (Becker in sod. 2010).

V raziskovalnem delu smo preverili metodo geometrijske morfometrije, s katero je mogoča hitra in nezahtevna identifikacija vrst komarjev. Sklepali smo, da je metoda zanesljivo orodje za prepoznavanje taksonov komarjev na morfološki osnovi (v našem primeru na osnovi kril).

HIPOTEZE NALOGE:

- (1) Taksoni so različno veliki in izkazujejo različno stopnjo variabilnosti.
- (2) Geometrijska morfometrija je zanesljivo orodje za prepoznavanje taksonov komarjev na morfološki osnovi.
- (3) Topologija taksonov v analizi kopičenja na osnovi morfoloških podatkov odseva filogenetski položaj skupin.
- (4) Morfološke razdalje so večje med rodovi kot med vrstami, kar je skladno s filogenijo.

1.1 Pregled objav

1.1.1 Diverziteteta komarjev

Komarji so izjemno pomembna skupina členonožcev, predvsem z negativnim ugledom zaradi njihove zmožnosti prenašanja patogenov, ki povzročajo človeku smrtonosne bolezni, kot so malarija, mrzlica denga, razni encefalitis, rumena mrzlica in druge. Izmed približno 3500 vrst in podvrst je kar več kot 100 znanih kot vektorjev povzročiteljev bolezni (Rueda 2007).

Ličinke komarjev se razvijajo v sladkovodnih habitatih in predstavljajo pomembno vlogo v ekološki prehranjevalni verigi (Rueda 2007). Spolno nezreli, začetni stadiji komarjev kolonizirajo raznolike habitate, kot so ribniki, potoki, močvirja, drevesna dupla. Ker je večina vrst sinantropnih, so se prilagodili tudi na umetne habitate, kot so gume, vaze, ptičje hranilnice ter drugi (Rueda in sod. 2006). Dejstvo, da je več vrst komarjev možno odkriti tudi v kontaminiranih, onesnaženih vodah (Mosquito magnet) kaže, da se komarji relativno hitro prilagajajo na nova, v tem primeru umetna okolja. Primer hitre adaptacije je nenehno širjenje tujerodnih vrst komarjev iz avtohtonih tropskih območij v območja z zmerno toplo klimo, kjer jim preživetje hladnih zim omogoča diapavza jajčec (Versteirt in sod. 2009). Z raznolikimi habitatami, ki jih lahko kolonizirajo ter izjemno sposobnostjo prilagajanja, se večajo tudi populacije komarjev (Rueda 2007), tako avtohtonih kot tudi tujerodnih vrst.

1.1.1.1 Taksonomski pregled

Komarje uvrščamo v deblo členonožcev (Arthropoda), razred žuželk (Insecta), red dvokrilcev (Diptera), podred komarjev in mušic (Nematocera) in v družino komarjev (Culicidae), katerih približno 3500 vrst delimo na dve poddružini: Anophelinae in Culicinae. V poddružino Anophelinae uvrščamo tri rodove, in sicer *Anopheles*, *Bironella* in *Chagasia*. Poddružina Culicinae je ločena na 11 skupin z 39 rodovi: Aedeomyiini (*Aedeomyia*), Aedini (*Aedes*, *Armigeres*, *Ayurakitia*, *Eretmapodites*, *Haemagogus*, *Heizmannia*, *Opifex*, *Psorophora*, *Tanakius*, *Udaya*, *Verrallina*, *Zeugomyia*), Cucini (*Culex*, *Deinocerites*, *Galindomyia*, *Lutzia*), Culisetini (*Culiseta*), Ficalbiini (*Ficalbia*, *Mimomyia*), Hodgesiini (*Hodgesia*), Mansoniini (*Coquillettidia*, *Mansonia*), Orthopodomyiini (*Orthopodomyia*), Sabethini (*Isostomyia*, *Johnbelkinia*, *Limatus*, *Malaya*, *Maorigoeldia*, *Onirion*, *Runchomyia*, *Sabethes*, *Shanoniana*, *Topomyia*, *Trichoprosopon*, *Tripteroides*, *Wyeomyia*), Toxorhynchitini (*Toxorhynchites*) in Uranotaeniini (*Uranotaenia*).

Diverziteteta komarjev se razlikuje po geografskih regijah sveta. Največjo diverziteteto vrst najdemo v **neotropski** regiji, in sicer kar 31 % znanih vrst, kjer največje število vrst pripada skupini Culicini, tej pa sledita skupini Aedini in Sabethini. Iz skupine Aedeomyiini je bila najdena le ena vrsta, medtem ko se skupini Ficalbiini in Hodgesiini tam ne pojavljata. Naslednja geografska regija s kar 30 % vrst je **orientalska** regija, kjer najdemo največje število vrst iz skupine Aedini, tej sledita Culicini in Sabethini, Orthopodomyiini, Hodgesiini, Culisetini in Aedeomyiini pa se pojavljajo z manjšim številom vrst. V **afrotropski** ter prav tako **avstralski** regiji najdemo 22 % vrst, obe regiji, kakor tudi **nearktična** in **palearktična**, pa vsebujeta največ vrst iz skupin Aedini in Culicini. Najmanjše število vrst Aedeomyiini in Orthopodomyiini najdemo v **afrotropski** in **avstralski** regiji. Najmanjše število vrst skupine Mansonini najdemo v **nearktični** regiji, medtem ko se skupine Aedeomyiini, Ficalbiini in Hodgesiini tam niti ne nahajajo. Prav tako vrst iz skupin Aedeomyiini in Hodgesiini v **palearktični** regiji ne najdemo, predstavniki skupine Orthopodomyiini pa so v najmanjšem številu (Rueda 2007).

Poleg tega, da komarji zasedajo izjemno raznolike habitate, je znano tudi, da jih najdemo praktično povsod po svetu, od tropov do zmerno toplih območij, z edino izjemo Antarktike in nekaj otokov, kjer niso prisotni. Uspešno se razmnožujejo v marsikaterih vodnih telesih od sladkovodnih do brakičnih voda (Rueda 2007), čistih ali onesnaženih, velikih ali majhnih, stoječih ali tekočih (Becker in sod. 2010). Edina izjema so morski habitati z visoko koncentracijo soli (Rueda 2007).

1.1.1.2 Komarji v Evropi

Od 92 najdenih vrst v Evropi (Becker in sod. 2010) so najštevilčnejše iz poddružine Culicinae, natančneje iz dveh skupin: Culicini in Aedini (Rueda 2007). To so tudi dokazali v raziskavi, kjer so vzorčili komarje treh držav, Švedske, Nizozemske in Italije (Möhlmann in sod. 2017). Od 11745 ujetih komarjev, jih je kar 90 % pripadalo rodovoma *Culex* in *Aedes*, z najpogostejšo vrsto *Culex pipiens* Linnaeus 1758, medtem ko so bili rodovi *Culiseta*, *Anopheles*, *Coquillettia* in *Uranotaenia* prisotni v manjšem številu. Bogastvo vrst in okolje, kjer so bili komarji številčnejši, se je med vzorčenimi državami razlikovalo: na Švedskem je bilo največ vrst komarjev ujetih v okolici mest, na Nizozemskem na kmetijah in v Italiji v močvirjih. Z rezultati so dokazali, da je bilo 25 % vrst najdenih v vseh treh državah, med njimi pa je bilo v vseh regijah ujetih pet vrst, ki so se tudi sicer pojavljale v največjem številu: *Anopheles maculipennis* Meigen 1818, *Culex pipiens*, *Aedes detritus* Haliday 1833, *Coquillettia richiardii* Ficalbi 1889 in *Culiseta annulata* Schrank 1776. Vrstna diverziteteta je bila višja v naravnih okoljih, verjetno predvsem zaradi raznolikosti habitatov in večjega števila potencialnih gostiteljev za samice. Države, ki so

bile zajete v raziskavi, se v združbah komarjev razlikujejo, saj povsod najdemo posebne in raznolike habitate, ki ustrezajo le določenim vrstam (Möhlmann in sod. 2017).

1.1.1.3 Komarji v Sloveniji

Zaradi majhnega števila raziskav v preteklosti še danes nimamo popolnega seznama vrst komarjev v Sloveniji (Šušnjar 2016). Do sedaj je bilo opisanih 30 vrst, vendar ker so bili v raziskave vključeni le določeni deli Slovenije, predvidevamo, da je seznam nepopoln (Šušnjar 2016). Na podlagi raziskave Danice Tovornik o favni komarjev na Ljubljanskem barju so identificirali naslednje vrste: *Culex modestus* Ficalbi 1889, *Culex torrentium* Martini 1925, prezimujoče in spomladanske vrste: *Anopheles claviger* Meigen 1804, *Culiseta morsitans* Theobald 1901, *Aedes excrucians* Walker 1856, *Aedes flavescens* Muller 1764, zgodaj poletne vrste: *Aedes cinereus* Meigen 1818, *Aedes vexans* Meigen 1830, *Aedes sticticus* Meigen 1838 in *Anopheles maculipennis*, vrste v avgustu: *Culiseta annulata* (najpogostejša), *Culex pipiens*, *Culiseta alaskaensis* Ludlow 1906 (Tovornik 1980). *Aedes cinereus* se pojavlja čez celo leto (Tovornik 1980). Vsaka vrsta naseljuje različne habitate, zasedajo od onesnaženih do čistih, stoječih zasenčenih voda (Tovornik 1980). V raziskavi so ugotovili, da tukaj navzoči komarji raje izbirajo zelo onesnažene vode (*Culiseta annulata*, *Culex pipiens*), zmerno onesnažene vode (*Aedes sticticus*) ter zelo čiste vode (*Anopheles claviger*, *Anopheles maculipennis*, *Aedes excrucians*, *Aedes annulipes* Meigen 1830, *Aedes vexans*) (Tovornik 1980). Na podlagi novejšega raziskovalnega dela so najpogostejše avtohtone vrste v umetnih habitatih v Sloveniji *Culex pipiens*, *Culex hortensis* Ficalbi 1889 in *Culiseta longiareolata* Macquar 1838 (Šušnjar 2016). Seznamu dveh invazivnih vrst najdenih v Sloveniji, *Aedes albopictus* Skuse 1894 in *Aedes japonicus* Theobald 1901 (Kalan in sod. 2014), pa je bila pred kratkim dodana še novo odkrita vrsta *Aedes koreicus* Edwards 1917 (Kalan in sod. 2017).

1.1.2 Filogenija komarjev

Družina komarjev (Diptera: Culicidae) je monofiletska skupina, kar dokazujejo tri odkrite sinapomorfije: pokončne luske na glavi, dolg obustni aparat razvit v bodalo - sesalo in ščetine pred krili (Harbach in Kitching 1998). Njihov evolucijski uspeh se opazi pri visokem številu vrst, velikemu številu adaptacij, njihovi biomasi in ekološki pomembnosti (Grimaldi in Endel 2005). Izjemna morfološka podobnost, predvsem bližje sorodnih vrst, (kriptične ali sestrške vrste) povzroča težave pri tradicionalni taksonomiji in reševanju filogenetskih odnosov (Reidenbach in sod. 2009).

Moderna taksonomija družino komarjev ločuje na dve poddružini, Anophelinae in Culicinae, ter 11 skupin z minimalno 42 rodovi (Rueda 2007). Raziskav o rodovnih

odnosih med komarji je izredno malo (Reidenbach in sod. 2009). Po prvih morfoloških razlikovanjih so potrebovali okoli 50 let za ponovno opredelitev filogenije komarjev, čemu je sledila zavrnitev večine hipotez z nekaj izjemami, ki so se obdržale: monofilija in bazalna pozicija poddružine Anophelinae ter monofilija skupin Sabethini in Culicini (Reidenbach in sod. 2009).

Znotraj skupine Sabethini zavzemata bazalno pozicijo rodova *Malaya* in *Maorigoeldia* (slednji vključuje le eno vrsto avtohtono Novi Zelandiji), in sta sestrski rodu *Tripteroides* (Reidenbach in sod. 2009). Prav tako so znotraj skupine Sabethini dokazali sestrski odnos med rodovoma *Tripteroides* in *Trichoprosopon*, kar potrjujejo tudi morfološki znaki (Reidenbach in sod. 2009).

Reidenbach in sod. (2009) so potrdili monofilijo rodov Novega sveta (*Limatus*, *Sabethes*, *Shannoniana*, *Trichoprosopon* in *Wyeomyia*) z rodovi *Limatus*, *Sabethes* in *Wyeomyia* v bližnjih odnosih in sestrskim odnosom med rodovoma *Shannoniana* in *Trichoprosopon*.

Že od nekdaj predstavljajo odnosi znotraj skupine Aedini problem, predvsem zaradi velikosti samega rodu, ki vsebuje okoli 1265 vrst (Mosquito Taxonomic Inventory) ter njihove kozmopolitske razširjenosti (Reinert in sod. 2004). Rod *Psorophora* se pojavi kot sestrski drugim znotraj skupine Aedini (Reidenbach in sod. 2009). Izjemno podporo so v raziskavi dobili sestrski odnosi med rodovoma *Aedes* + *Eretmapodites* in *Haemagogus* + *Ochlerotatus*, medtem ko so ostali odnosi manj jasni (Reidenbach in sod. 2009)

1.1.2.1 Ocena divergenc

Družina komarjev najverjetneje izvira iz jure (145-200 Ma) (Bertone in sod. 2008) skupaj s sestrsko skupino Chaoboridae (Borkent 1993). Evolucijski odnosi v družini še vedno predstavljajo problem zaradi pomanjkanja fosilnih ostankov. Tradicionalna klasifikacija jih ločuje predvsem na podlagi morfoloških podobnosti (Reidenbach in sod. 2009). Reidenbach in sod. (2009) so na podlagi vzorčenih vrst in treh fosilnih ostankov določili prvo divergenco znotraj komarjev med poddružinama Anophelinae in Culicinae, na pred približno 226 Ma. Precej plitko in pozno ločitev pred približno 51 Ma pa so pokazali med rodovoma *Anopheles* in *Bironella*, kljub temu da je zgodnja odcepitev rodu *Anopheles* znotraj družine komarjev splošno sprejeta. Dobro podporo sta v filogenetski analizi dobili skupini Aedini in Sabethini, ki naj bi se pojavili pred okoli 112 in 115 Ma in divergirali kasneje. Globoke notranje veje filogenetskega drevesa predstavlja 8 rodov: *Aedeomyia*, *Coquillettia*, *Culiseta*, *Culex*, *Mimomyia*, *Orthopodomyia*, *Toxorhynchites*, *Uranotaenia*, cepitve med katerimi so stare več kot 127 Ma in relativno blizu skupaj v času, približno v intervalu 30 milijonov let, med 127 in 158 Ma. Ti rezultati dokazujejo hitro radiacijo

komarjev, kar je potencialno tudi en izmed razlogov, zakaj se pojavljajo takšne težave pri razreševanju njihovih filogenetskih odnosov (Reidenbach in sod. 2009). Hitra radiacija družine komarjev se sklada s pojavom kritosemenk okoli 130 Ma (Grimaldi in Endel 2005).

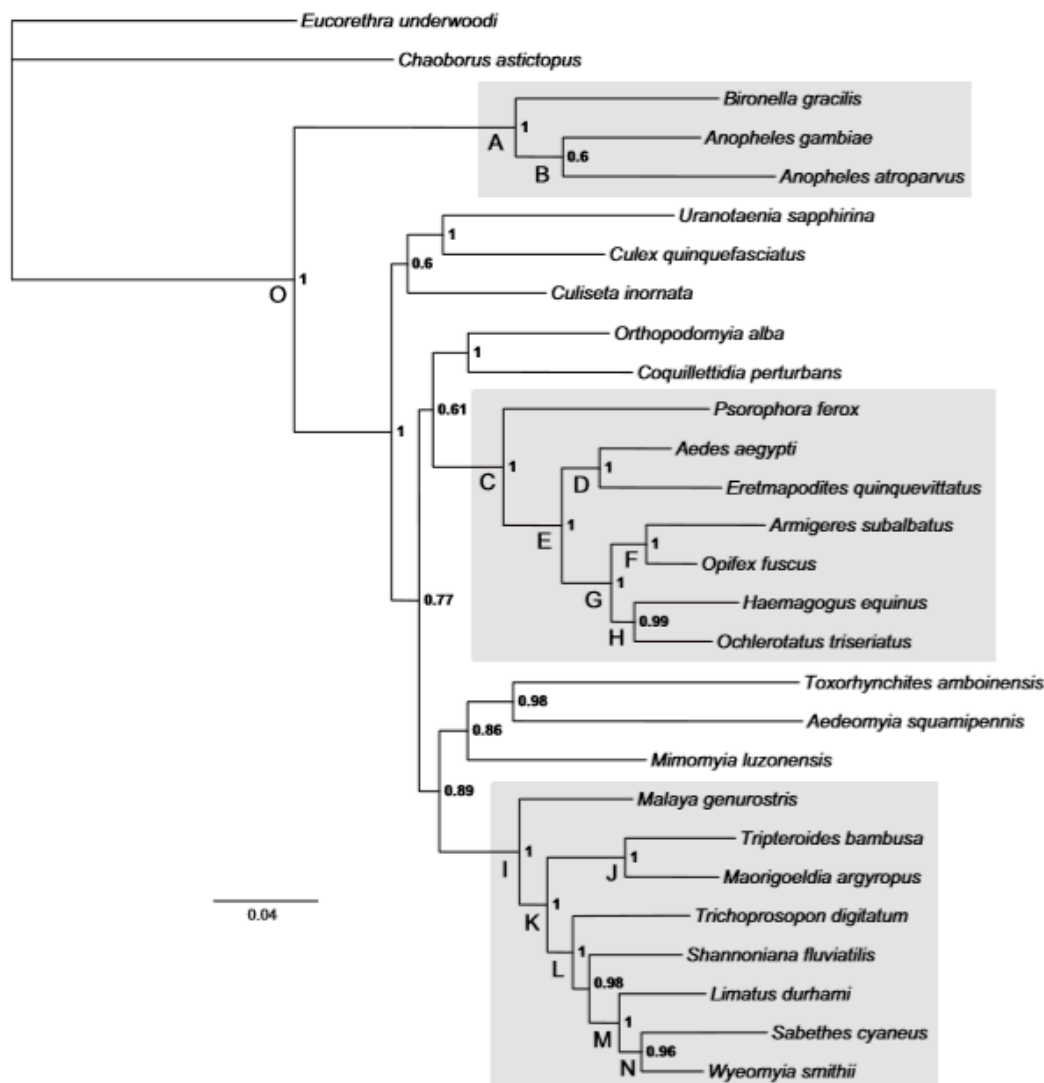


Figure 3
Phylogram of relationships among mosquito species, inferred by Bayesian likelihood analysis of combined amino acids. Amount of inferred character change is indicated by the scale bar below. Numbers associated with nodes are Bayesian posterior probabilities above 0.5. Letters associated with nodes refer to bootstrap support values and posterior probabilities estimated from alternative analyses, provided in Table 6. Gray-shaded boxes enclose (from top to bottom) Anophelinae, Aedini and Sabethini.

Slika 1. Filogenetsko drevo komarjev (povzeto po Reidenbach in sod. 2009).

Večina vrst predstavlja razne homoplazije, veliko odnosov je še vedno nerešenih, hkrati pa je popolno razlikovanje na podlagi morfologije izredno težko (Reidenbach in sod. 2009).

1.1.3 Tradicionalne metode prepoznavanja komarjev

Za prepoznavanje komarjev se tradicionalno še vedno uporabljajo določevalni ključi, ki so osnovani na podlagi morfoloških značilnosti točno določenih življenjskih stadijev in spola (Munstermann in Conn 1997). Pomagamo si z lupo oz. mikroskopom, saj nam njihova velikost onemogoča razlikovanje s prostim očesom. Pri identifikaciji se hitro pojavi problem, saj so določevalni ključi za evropske vrste dokaj pomanjkljivi (Becker in sod. 2010), prav tako morfološka identifikacija ni mogoča v primeru, da so osebki poškodovani (Wilke 2016). V knjigi *Mosquitoes and their control* avtorji predlagajo študij osnovne morfologije komarjev pred samo identifikacijo (Becker in sod. 2010). V pomoč pri razlikovanju pride v poštev tudi poznavanje razširjenosti taksonov skupaj z informacijo o bioekoloških pogojih, ki ustrezajo posameznim vrstam (Becker in sod. 2010).

Pri klasični identifikaciji na podlagi morfologije se hitro pojavijo težave, saj strokovnjakov primanjkuje. Vektorske lastnosti komarjev so namreč zanimive predvsem za genetike in zdravnike. Večjemu številu raziskav bo nedvomno sledilo večje število koristnih podatkov kot osnova za nadaljnje raziskave (Lopez in Mengual 2015).

1.1.3.1 Morfološki znaki

Znak, značilen za vse dvokrilce, je prvi par pravih kril, medtem ko je drugi par zakrnel in majhen, imenovan haltere. Glavni znak, ki loči komarje od ostalih dvokrilcev, je bodalo - sesalo ali proboscis (UTEP 2004), podaljšan del obustnega aparata odraslih živali, s pomočjo katerega samice srkajo kri (Reinbach 2009). Prav tako je pomembna značilnost luskavost kril, po kateri se razlikujejo od drugih pravih muh (Brachycera). Njihova velikost se med rodovi razlikuje (Slika 2). Sprednji del glave sestavlja podaljšano bodalo - sesalo, par maksilarnih palpov in par anten. Slednje so pomemben morfološki znak za razlikovanje samcev in samic: samci z zelo gostim in samice z redkejšim odlačenjem. Vsaka antena je sestavljena iz 15-ih členov, od katerih je prvi običajno precej neopazen, na zadnjih 13-ih pa se pojavljajo dlačice. Dolžina anten je približno enaka ali krajša kot bodalo - sesalo, razen pri enem rodu, kjer so te daljše. Obstaja le en rod komarjev, pri katerih bodalo - sesalo samic ni prilagojeno sesanju krvi in je zato ukrivljeno navzdol. Maksilarni palpi se nahajajo na obeh straneh bodala - sesala in so, z izjemo enega rodu, precej kratki. Komarjevo oprsje se deli na tri glavne dele: predprsje, na katerega je pritrjen prvi par nog, medprsje, na katerega je pritrjen drugi par nog in par kril, ter zaprsje, na katerega je pritrjen zadnji par nog in par halter. Obarvanost lusk na trupu je pomemben določevalni znak pri nekaterih rodovih in vrstah komarjev. Nekatere rodove se loči tudi na podlagi dorzalnega dela mezotoraksa, katerega največji del sestavlja mezonotum ali trdni ščitek. Na posteriornem robu mezonotuma se nahaja tridelna ali enodelna zaobljena

struktura imenovana trikotni ščitek (skutelum). Na trupu se pojavljajo pomembni taksonomski znaki, kot na primer prisotnost ali odsotnost in sama razporeditev dlačič in ščetin. Tukaj je vredno omeniti prespirakularne in postspirakularne ščetine. Zadek je sestavljen iz osmih vidnih členov, kjer je konec zadka s parom cerkov lahko koničast ali pa zaobljen. Pomembne znake pri določevanju predstavljajo tudi krila, njihova ožiljenost in luske z značilnimi vzorci. Noge se delijo na pet delov: kolček, obrtec, stegence, golence in stopalce, kjer je stopalce (tarsus) prav tako iz petih delov; njihova dolžina je včasih uporabna kot določevalni znak (UTEF 2004).



Slika 2. Variabilnost velikosti pri komarjih; levo zgoraj - *Anopheles*, desno zgoraj - *Wyeomyia*, levo spodaj - *Coquillettidia*, desno spodaj - *Toxorhynchites* (UTEF, Slide 5).

Veliko vrst komarjev je shranjenih v muzejskih zbirkah, vendar so te tako slabo ohranjene, da so molekulske raziskave pravzaprav nemogoče. Potrebne bi bile nove muzejske zbirke predvsem malo raziskanih vrst iz delov sveta s centri razširjenosti za komarje (Reidenbach in sod. 2009).

1.1.3.2 Morfološka variabilnost

Visoka morfološka variabilnost je vzporedna njihovi radiaciji v praktično kakršnokoli obliko vode (Grimaldi in Endel 2005). Zunanji dejavniki lahko vplivajo na morfologijo komarja, kar zaradi neskladij v znakih vpliva na samo razlikovanje med vrstami na podlagi morfoloških znakov (le Sueur 1992). Problem se pojavi pri razreševanju odnosov bližje sorodnih vrst (kriptičnih ali sestrskih) zaradi izjemno podobne morfologije (Reidenbach in sod. 2009).

Na podlagi raziskave v Andih Kolumbije je rod *Culex* najbolj vrstno bogat in raznolik, kozmopolitski in en izmed največjih rodov v družini Culicidae (Lopez in Mengual 2015). Morfološka identifikacija, predvsem samic rodu *Culex*, je problematična zaradi polimorfizmov in dvoumnosti morfoloških znakov (Laurito in sod. 2013). Pri samcih naj natančnejšo določitev vrste omogočajo spolni organi (Laurito in sod. 2013).

Veliko vrst rodu *Anopheles* je morfološko praktično nemogoče ločiti (White in sod. 2011). Možnost identifikacije in razločevanja nekaterih vrst je tako uspešna le s pomočjo genetskih raziskav (White in sod. 2011).

Mattingly (1957) je v svoji obsežni raziskavi predpostavil, da je *Aedes aegypti* Linnaeus in Hassequist 1762 ena izmed najbolj variabilnih vrst komarjev, predvsem glede obarvanosti. Pogosto imajo samci marsikatero vrsto manj ščetin in lusk v primerjavi s samicami (Reinert in sod. 2006) (Reinert in sod. 2008).

Pri samicah vrste *Aedes aegypti* so ugotovili, da se njihova morfološka variabilnost razlikuje tudi glede na sezono, v tem primeru glede na sušna in deževna obdobja (Paupy in sod. 2010).

1.1.3.3 Genetska variabilnost

Prilagoditve komarjev, ki smo jim priča v zadnjem stoletju, so osupljive. Klimatske spremembe in najbolj množično naseljevanje človeških populacij v zgodovini Zemlje po celem planetu so pripomogli k močnim selekcijskim pritiskom za evolucijo antropofilije komarjev, predvsem z ustvarjanjem umetnih in ekstremnih habitatov (Paupy in sod. 2010) kot so onesnažene vode in bivalni prostori človeka.

Na primeru vrste *Aedes aegypti* so dokazali, da so genetske razlike med populacijami odvisne od pretekle zgodovine zasedanja novih območij in habitatov (Failloux in sod. 2002). Pogosto nove habitate najprej zasedejo manjše populacije, zaradi česar pride do padca genetske variabilnosti. Ta se s povečanjem populacije preko novih introdukcij lahko zaradi novih mutacij zopet poveča (Nei in sod. 1975). S ponovnimi introdukcijami komarjev s pomočjo človeka (z raznimi transporti) se tudi večja genetski pretok med populacijami istih vrst (Kamau in sod. 1999), kar povečuje njihovo genetsko variabilnost. V raziskavi so Minard in sod. (2015) primerjali genetsko raznolikost med avtohtono populacijo tigrastega komarja v Vietnamu in tujerodno populacijo v Franciji. Ugotovili so, da imajo evropske populacije nižjo genetsko variabilnost, kar je pričakovano zaradi t.i. ustanoviteljevega učinka (*founder effect*) in genetskega zdrsa (Dlugosch in Parker 2008). Poleg naštetega je lahko razlog za nizko variabilnost tudi fragmentacija okolja. Variacije

med populacijami so velikokrat povezane z okoljskimi vplivi samega habitata (Minard in sod. 2015). S pomanjkanjem habitatov, ki so pomembni za razvoj živali, lahko pride tudi do večje možnosti genetskega zdrsa, kar so dokazali pri vrsti *Aedes aegypti*, kjer so posledice tega pojava opazili na spremembah v morfologiji (Paupy in sod. 2010).

1.1.4 Napredne morfološke metode

1.1.4.1 Geometrijska morfometrija

Z ravojem sofisticiranih metod, univariatnih in zlasti multivariatnih statističnih analiz in računalniških orodij za njihovo izvedbo (npr. korelacijski koeficient, analiza variance in analiza glavnih komponent: PCA), je postalo mogoče kvantitativno analizirati biološko raznolikost. Geometrijska morfometrija je napredna metoda za ocenjevanje povezav med obliko in okoljskimi ali genetskimi značilnostmi. To velja predvsem za komarje in druge žuželke, še posebno iz družine Culicidae. Imajo dvodimenzionalna krila, na katerih so traheje (v nadaljevanju žile), s katerih lahko povzamemo naravne anatomske značilnosti kril (točke, *landmarks*: LM). Koordinate teh LM predstavljajo bistvo geometrijske morfometrije (Lorenz in sod. 2017).

Metoda je uporabna predvsem za reševanje problemov medvrstnega in znotrajvrstnega določevanja, spolnega dimorfizma (Lorenz in sod. 2017), kriptičnih vrst ter identifikacije samic, saj se pri nekaterih vrstah ločijo po spolnih organih le samci (Wilke in sod. 2016). Možna je tudi zaznava variabilnosti, ki se pokaže v obliki in velikosti kril pri komarjih, izpostavljenih stresnemu okolju (Lorenz in sod, 2017). Zaradi značilnih vedenjskih vzorcev in fiziologije komarjev lahko krila zagotavljajo pomembne informacije o razširjenosti vektorjev bolezni in njihovi kontroli (Mondal in sod. 2015), prav tako se posledice mikroevolucijskih procesov izredno hitro pokažejo na krilih, s čimer lahko odkrijemo majhne, vendar pomembne vire variabilnosti (Wilke in sod. 2016). Pogosto se zgodi, da komarji niso popolnoma ohranjeni, vendar z geometrijsko morfometrijo lahko pridemo do željenih rezultatov (zlasti pri njihovi identifikaciji) tudi s poškodovanimi in neohranjenimi primerki (Vidal in sod. 2011). Hitrost, cenovna ugodnost in zanesljivost so dodatne prednosti metode geometrijske morfometrije (Lorenz in sod. 2017).

Metoda ni nujno enako nedvoumna kot genetske raziskave, vendar so rezultati dokazali, da je lahko izredno informativna in ima svoje prednosti. Povsem zato, ker je hitra in poceni, primerna za nestrokovnjake ter uporabna tudi na samem terenu, je primerna za hitro reševanje tako ekoloških kot taksonomskih problemov (Lorenz in sod. 2017).

1.1.4.2 Molekulske metode

Diagnostične metode na podlagi DNK so pomembne pri raziskavah vektorjev bolezni in molekularnih študijah, prav tako pa so uporabne za natančno identifikacijo bližje sorodnih in morfološko podobnih vrst, kakor tudi za razreševanje filogenetskih odnosov med njimi (Patsoula in sod. 2006). Molekulske študije zagotavljajo natančno vrstno določitev na podlagi vseh življenjskih stadijev, tudi s poškodovanimi primerki (Patsoula in sod. 2006). Identifikacija na podlagi verižne reakcije s polimerazo (*Polymerase chain reaction*) je pomembna metoda, saj je lahko uporabna v vseh razvojnih stadijih komarja, tudi z majhnim vzorčnim tkivom (Patsoula in sod. 2006). Primer je COI gen, ki je zelo uporaben marker za ocenjevanje odnosov med bližje sorodnimi žuželkami predvsem v redu dvokrilcev (Diptera) (Patsoula in sod. 2006). Pogosto se uporabljajo tudi SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*), ki so najbolj pogost vir genetske variabilnosti med posameznimi organizmi (Demirci in sod. 2012). Podatki o genetski variabilnosti in genskem pretoku med populacijami so pomembni zaradi ocenjevanja disperzij in drugih pomembnih genetskih lastnosti, kakor je na primer sposobnost prenosljivosti patogenov in odpornost do insekticidov (Demirci in sod. 2012). Pogosto so molekularne metode uporabljene kot sekundarna potrditev rezultatov morfometrije ali drugih tradicionalnih metod.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Seznam vrst

V geometrijsko morfometrijsko analizo smo vključili devet pogostih vrst komarjev iz Slovenije. Osnovne podatke o izvoru vzorcev podajamo v Preglednici 1. Vzorci so shranjeni v zbirki Katje Kalan na Fakulteti za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije.

Preglednica 1. Seznam vrst z mesecem in letom ter lokacijo vzorčenj.

Družina	Poddružina	Rod	Vrsta	Mesec in leto vzorčenj	Lokacija vzorčenj
Culicidae	Anophelinae	<i>Anopheles</i>	<i>An. plumbeus</i> Stephens 1828	junij, 2015	Idrija
	Culicinae	<i>Aedes</i>	<i>Ae. albopictus</i>	junij-avgust, 2012	Koper
			<i>Ae. albopictus</i>	junij, 2012	Škocjan
		<i>Aedes</i>	<i>Ae. geniculatus</i> Olivier 1791	junij, 2012	Godovič
		<i>Aedes</i>	<i>Ae. japonicus</i>	avgust, 2016	Divača
			<i>Ae. japonicus</i>	avgust, 2016	Črni Kal
			<i>Ae. japonicus</i>	september, 2015	Bistrica ob Sotli
		<i>Coquillettidia</i>	<i>Co. richiardii</i>	avgust, 2015	Nova Gorica
			<i>Co. richiardii</i>	julij, 2012	Bertoki
		<i>Culex</i>	<i>Cx. hortensis</i>	junij, 2015	Zbilje
			<i>Cx. hortensis</i>	avgust, 2015	Cerkno
			<i>Cx. hortensis</i>	september, 2015	Gornji Grad
			<i>Cx. hortensis</i>	junij, 2015	Kranj
			<i>Cx. hortensis</i>	september, 2015	Slovenj Gradec
			<i>Cx. hortensis</i>	avgust, 2015	Loški Potok
			<i>Cx. hortensis</i>	junij, 2015	Mojstrana
			<i>Cx. hortensis</i>	junij, 2015	Tomažiči
		<i>Culex</i>	<i>Cx. pipiens</i>	avgust, 2012	Škocjan
			<i>Cx. pipiens</i>	junij-avgust, 2012	Koper
			<i>Cx. pipiens</i>	avgust, 2012	Bertoki

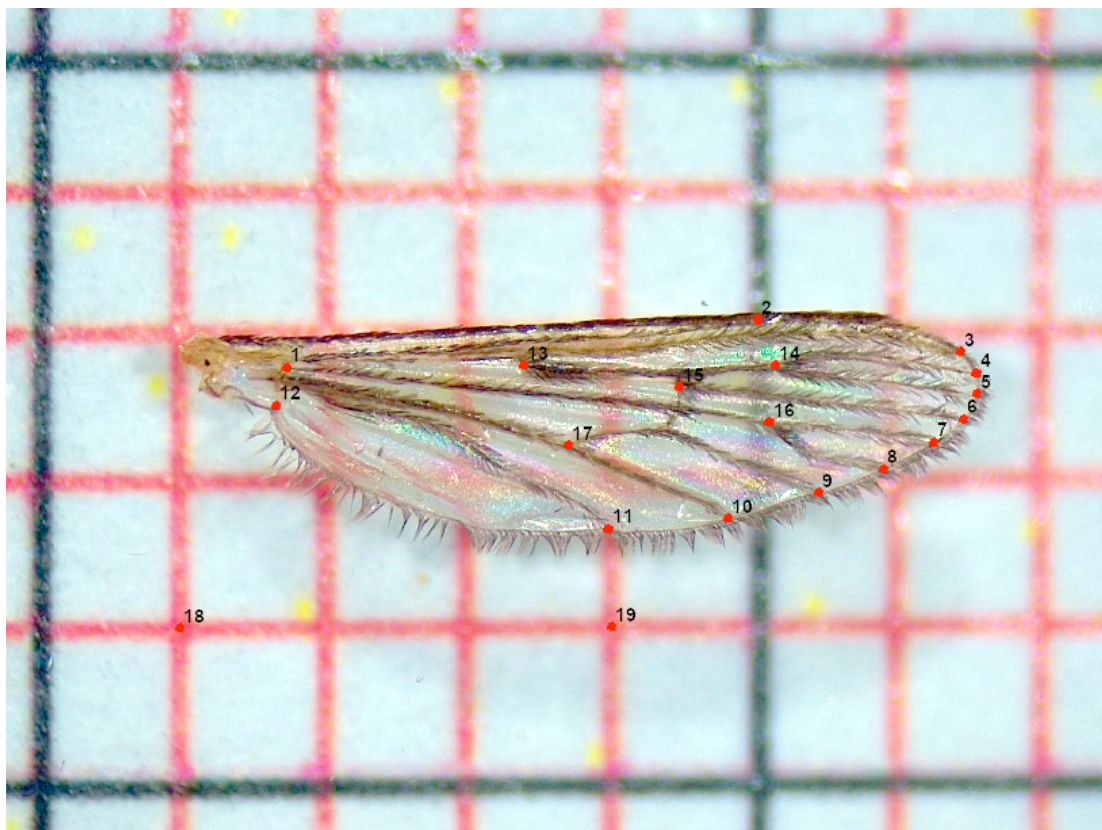
	<i>Cx. pipiens</i>	junij, 2012	Tomažiči
<i>Culiseta</i>	<i>Cu. annulata</i>	junij-avgust, 2012	Bertoki
<i>Ochlerotatus</i>	<i>Oc. caspius</i> Pallas 1771	junij, 2012	Bertoki
	<i>Oc. caspius</i>	junij, 2012	Koper

2.2 Priprava živali

Zamrznjenim živalim smo previdno odstranili levo krilo, v primeru da je bilo polomljeno, pa smo levo krilo nadomestili z desnim. Tako smo močno zmanjšali morebitni vpliv asimetrije telesa. Nato smo za vsako krilo posebej izdelali netrajni preparat ter krilo slikali pod lupo (Leica EZ4W) na milimetrskem merilcu.

2.3 Meritve

Na fotografiji vsakega krila smo s pomočjo programa TPS DIG (Morphometrics at Suny Stony Brook) vnesli 17 LM, 18. in 19. LM sta predstavljal merilo (Slika 3). Iz tega smo sestavili TPS datoteke, ki smo jih potrebovali za nadaljnjo analizo.



Slika 3. Uporabljeni LM z merilom (vrsta: *Culiseta annulata*) (Foto: Aja Golob)

2.4 Obdelava podatkov in statistična analiza

TPS datoteke smo vstavili v program TPS RELW (Morphometrics at Suny Stony Brook), ki preverja podatke in s tem ugotovili kredibilnost naše postavitve točk. Program TPS UTIL (Morphometrics at Suny Stony Brook) smo nato potrebovali za združitev vseh TPS dokumentov. S programom smo tudi uredili vrstni red merjenih živali. Z združenimi TPS datotekami smo lahko nadaljevali v programu COORDGEN (Canisius College), ki preveri vsa prekrivanja in ujemanja LM ter skalira velikost centroidov (*centroid size*: CS) in koordinate vseh LM. V tem programu smo tudi določili, katera LM sta veljala za merilo. Pridobljene podatke smo shranili kot excel datoteko.

Nato smo v programu MORPHOJ (Klingenberg 2011) opravili naslednje statistične analize: analizo glavnih komponent (PCA), ki izpostavi največjo variabilnost med danimi podatki in diskriminacijsko analizo (CVA), katere cilj je izpostaviti največjo možno ločljivost med znanimi kategorijami glede na izmerjene znake.

Delali smo primerjavo velikosti in oblike na dveh ravneh: (1) med rodovi in (2) med vrstami. Še posebej smo bili pozorni na razlike med vrstami, ki pripadajo enemu rodu (*Aedes* – tri vrste, *Culex* – dve vrsti).

Za velikost, ki jo merimo s CS, kar predstavlja merilo velikosti in oblike na podlagi določenih LM (A Glossary for Geometric Morphometrics), smo za obe ravni izračunali opisno statistiko in koeficient variacije ($KV = 100 \cdot SD / X_{povp.}$), da bi ugotovili, kakšna je stopnja variabilnosti v velikosti. Razlike med rodovi in vrstami smo testirali z enosmerno analizo variance (če so skupine tri ali več, $p < 0.001$) in T-testom (kadar sta skupini dve). Posthoc primerjave z Games-Howell testom pa so pokazale še na razlike med posameznimi pari taksonov ($p < 0.05$). Podobnosti in razlike v obliki med taksoni (rodovi oz. vrstami) smo prikazali z analizo glavnih komponent in diskriminacijsko analizo. Obe analizi smo najprej izvedli na nivoju rodov, nato pa še za vrste znotraj rodov *Culex* (dve vrsti) in *Aedes* (tri vrste) (celotna preglednica s podatki enosmerne analize variance je v Prilogi A).

Za rod *Culex* smo naredili T test, da bi poiskali znake, ki se statistično značilno ($p < 0.05$) razlikujejo med vrstama. Le te izbrane znake (izjema je CS, za katerega smo rezultate prikazali ločeno) smo nato vključili v diskriminacijsko analizo.

Izračun Mahalanobisovih razdalj, ki nam pojasnjujejo razdaljo med dvema točkama (v našem primeru centroidi skupin) v multivariatnem prostoru (Statistics How To), med pari taksonov smo uporabili kot pokazatelj morfološke podobnosti med posameznimi pari in jih primerjali z genetskimi razdaljami v filogenetskem drevesu (Slika 1). Tako smo

ugotavljali, ali višja stopnja sorodnosti odraža tudi višjo stopnjo podobnosti, in ali to velja na nivoju poddružin (Culicinae, Anophelinae) ali tudi nižje (rodov in vrst). Dodatno smo topologijo v drevesu kopičenja na podlagi morfoloških podatkov primerjali še s topologijo filogenetskega drevesa (Slika 1), le da smo za morfološke podatke uporabili analizo kopičenja (Wardova metoda), ki jo nekateri avtorji (Jugovic 2010) priporočajo ob uporabi morfoloških podatkov.

Da bi ugotovili uspešnost identifikacije taksonov, smo na obeh nivojih opravili še klasifikacijske (brez prečnega preverjanja) in reklasifikacijske (s prečnim preverjanjem) teste. Visoka stopnja pravilnih uvrstitev kaže, da so taksoni glede na izmerjene točke jasno različni, morebitno medsebojno prekrivanje pa nakazuje, da je identifikacija na podlagi izmerjenih LM manj zanesljiva.

Analizo glavnih komponent in diskriminacijsko analizo, prav tako pa še oba postopka klasifikacije in reklasifikacije smo ponovili še s postopno (stepwise) metodo, ki dodatno zmanjša število znakov, potrebnih za ločevanje skupin in hkrati zmanjša soodvisnost med znaki, ki ob visoki soodvisnosti merijo enako dimenzijo v morfološkem prostoru.

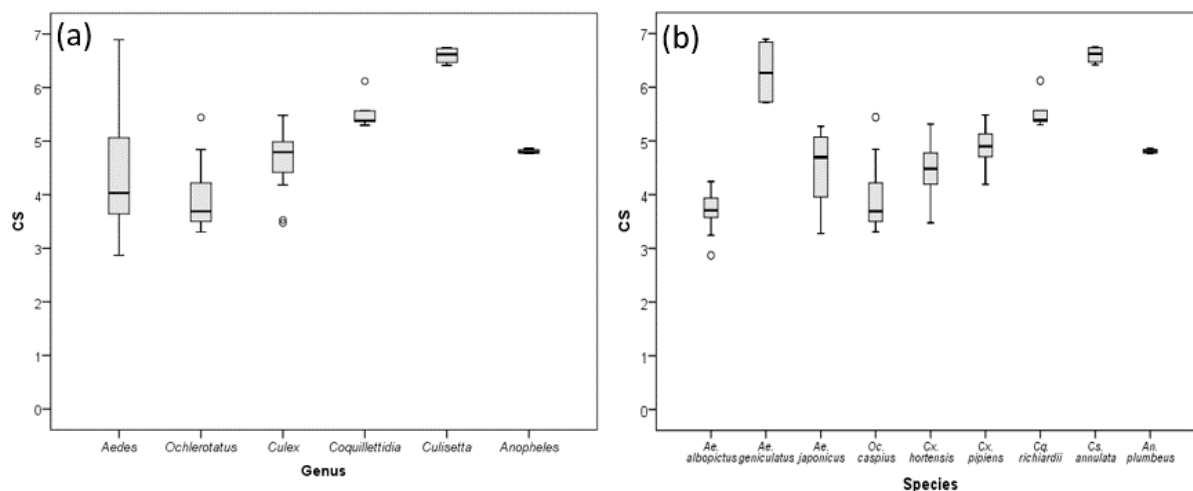
3 REZULTATI IN DISKUSIJA

3.1 Rezultati

3.1.1 Velikost

Srednja vrednost (mediana in povprečje) velikosti centroida iz 17 LM na ravni rodov (Slika 4a) je znotraj poddružine Culicinae (rodovi *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Culex*, *Coquillettidia*, *Culiseta*) najvišja pri rodu *Culiseta*, najmanjša pa pri rodu *Ochlerotatus* (Preglednica 2). Razlike v velikosti centroida so med rodovi statistično značilne (ANOVA, $p < 0,001$), prav tako pa tudi med vrstami znotraj rodov *Aedes* (tri vrste, ANOVA, $p < 0,001$) in *Culex* (2 vrsti, T-test, $p < 0,01$). Rod *Aedes*, ki ga v naši analizi zastopajo tri vrste, je bil tudi najbolj variabilen (CV = 23 %), sledita rodova *Ochlerotatus* (vrsta *O. caspius*, CV = 14,5 %) in *Culex* (dve vrsti; CV = 10,2 %), za najmanj variabilne v velikosti pa so se izkazali rodovi *Coquillettidia*, *Culiseta* in *Anopheles*, ki so v analizi zastopani vsak z le po eno vrsto in pet ali le štirimi živalmi (CV < 7,0 %). Slednji rod pripada svoji poddružini (Anophelinae) in je po velikosti centroida zelo blizu tukaj analiziranim predstavnikom rodu *Culex* (Preglednica 2). Rezultati post-hoc testov primerjav med pari taksonov za vse znake so predstavljeni v Prilogi B.

Znotraj rodu *Aedes* ima največjo velikost centroida *Ae. geniculatus* (CV = 8,2 %), sledita pa *Ae. japonicus* (CV = 15,3 %) ter *Ae. albopictus* (CV = 9,1 %). V rodu *Culex* je *Cx. pipiens* nekoliko večji od *Cx. hortensis*, a je slednji nekoliko bolj variabilen (CV = 12,1 %) od prvega (CV = 7,1 %; Preglednica 2, Slika 4b).



Slika 4. Srednja vrednost velikosti centroida (CS); (a) na nivoju rodov (*Genus*), (b) na nivoju vrst (*Species*).

Preglednica 2. Število osebkov (N), srednja vrednost velikosti centroida (mediana in povprečje), 95 % intervalom zaupanja za povprečje (95 % CI), standardno deviacijo (SD) in koeficientom variabilnosti (CV).

Rod/vrsta	N	Mediana	Povprečje	95 % CI	SD	CV
<i>Aedes</i>	41	4,03	4,39	4,07–4,71	1,01	23,0 %
<i>Ae. albopictus</i>	20	3,71	3,72	3,56–3,88	0,34	9,10 %
<i>Ae. geniculatus</i>	6	6,26	6,28	5,74–6,82	0,52	8,20 %
<i>Ae. japonicus</i>	15	4,69	4,53	4,14–4,91	0,69	15,33 %
<i>Ochlerotatus caspius</i>	20	3,69	3,91	3,64–4,17	0,57	14,54 %
<i>Culex</i>	32	4,79	4,71	4,54–4,88	0,48	10,22 %
<i>Cx. hortensis</i>	12	4,48	4,41	4,07–4,74	0,53	12,07 %
<i>Cx. pipiens</i>	20	4,90	4,89	4,73–5,06	0,35	7,11 %
<i>Coquillettidia richiardii</i>	5	5,39	5,55	5,13–5,96	0,34	6,04 %
<i>Culiseta annulata</i>	4	6,62	6,60	6,35–6,85	0,16	2,38 %
<i>Anopheles plumbeus</i>	4	4,80	4,81	5,13–5,96	0,04	0,88 %

3.1.2 Oblika

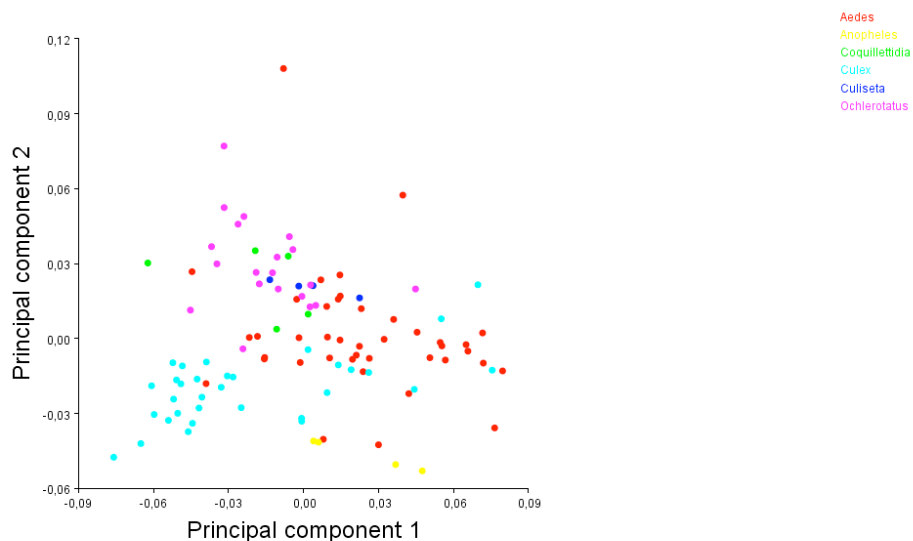
3.1.2.1 Znotraj in medrodovna variabilnost

V analizi glavnih komponent na ravni šestih rodov 30 glavnih komponent pojasni vso varianco, od tega prvih osem pojasni več kot 90 % skupne variabilnosti podatkov (Preglednica 3). Tretjino skupne variance pojasni prva komponenta, a projekcija živali vzdolž prvih dveh primarnih komponent kaže na zvezno prehajanje med rodovi, s tem da se rodovi *Culex*, *Coquillettidia* in *Ochlerotatus* razporedijo večinsko v levem (Slika 5), *Aedes* in *Anopheles* pa v desnem delu postopa; v srednjem delu postopa vzdolž prve primarne komponente se razporedi preostali rod, *Culiseta*. Prekrivanje med rodovi je opazno tudi vzdolž druge primarne komponente, kjer se v spodnjem delu postopa razporedita *Anopheles* in *Culex*, v zgornjem delu pa preostali štirje rodovi (Slika 5).

Preglednica 3. Rezultati analize glavnih komponent za vseh 6 rodov; seznam prvih osmih funkcij (PC) z lastnimi vrednostmi, odstotki pojasnjene variance in kumulativni odstotki.

PC	Lastna vrednost	% pojasnjene variance	Kumulativni %
1	0,00140794	33,165	33,165
2	0,00076591	18,041	51,206
3	0,00059331	13,976	65,182
4	0,00036297	8,550	73,732
5	0,00023809	5,608	79,340
6	0,00019947	4,699	84,039

7	0,00013154	3,099	87,137
8	0,00012185	2,870	90,007

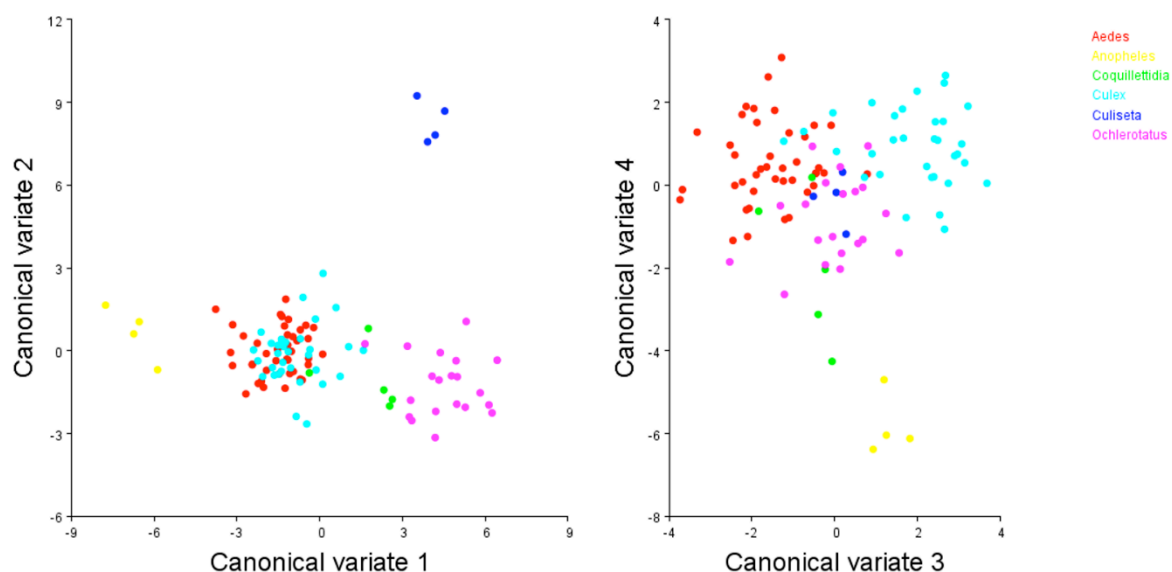


Slika 5. Projekcija komarjev iz šestih rodov vzdolž prvih dveh primarnih komponent (*Principal component*) ob upoštevanju koordinat za 17 LM.

V diskriminacijski analizi šestih rodov pet osi pojasni celotno variabilnost podatkov (Preglednica 4), vsaka os pa statistično značilno ločuje vsaj dva rodova ($p < 0,002$). Prva os pojasni 48,8 %, druga 19,5 %, tretja 13,6 %, četrta 12,8 % ter peta os preostanek variabilnosti podatkov (Preglednica 4). Že vzdolž prve osi se od preostalih jasno loči rod *Anopheles*, vzdolž druge osi pa še rod *Culiseta*. Vzdolž prve osi se loči še rod *Ochlerotatus* od para rodov *Aedes* in *Culex*, med njima pa se v morfološkem prostoru nahaja še *Coquillettidia*. Tretja os z manjšim prekrivanjem ločuje rodova *Aedes* in *Culex*, četrta os pa dodatno ločuje rod *Anopheles* od vseh ostalih (Slika 6). Šele peta os ločuje tudi rod *Coquillettidia* od ostalih.

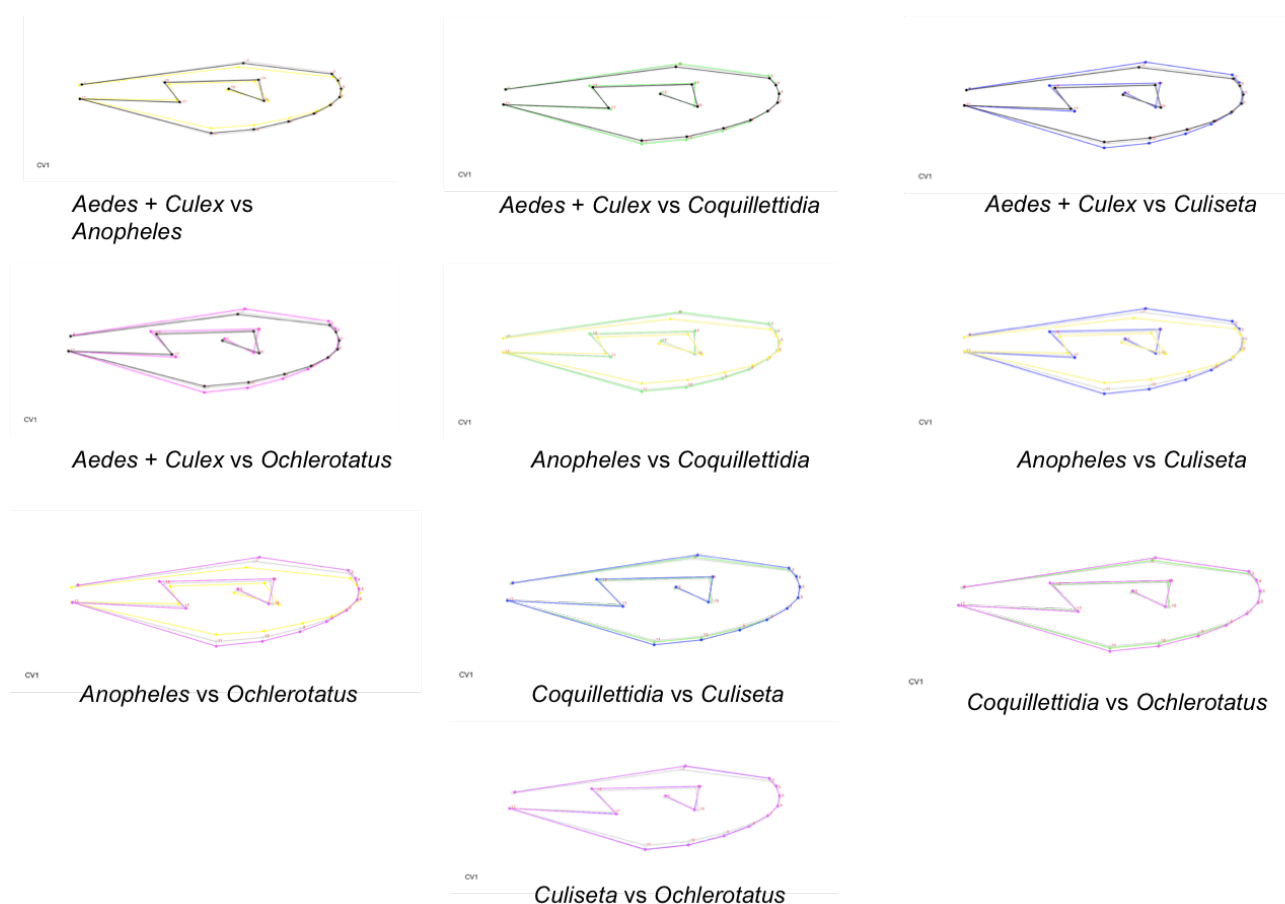
Preglednica 4. Rezultati diskriminacijske analize za vseh 6 rodov; seznam vseh diskriminacijskih funkcij (DF) z lastnimi vrednostmi, odstotki pojasnjene variance, kumulativni odstotki in signifikanco.

DF	Lastna vrednost	% pojasnjene variance	Kumulativni %	Sig.
1	7,91386	48,796	48,796	<0,001
2	3,16463	19,513	68,308	<0,001
3	2,20964	13,624	81,933	<0,001
4	2,07844	12,815	94,748	<0,001
5	0,85181637	5,252	100,000	<0,002



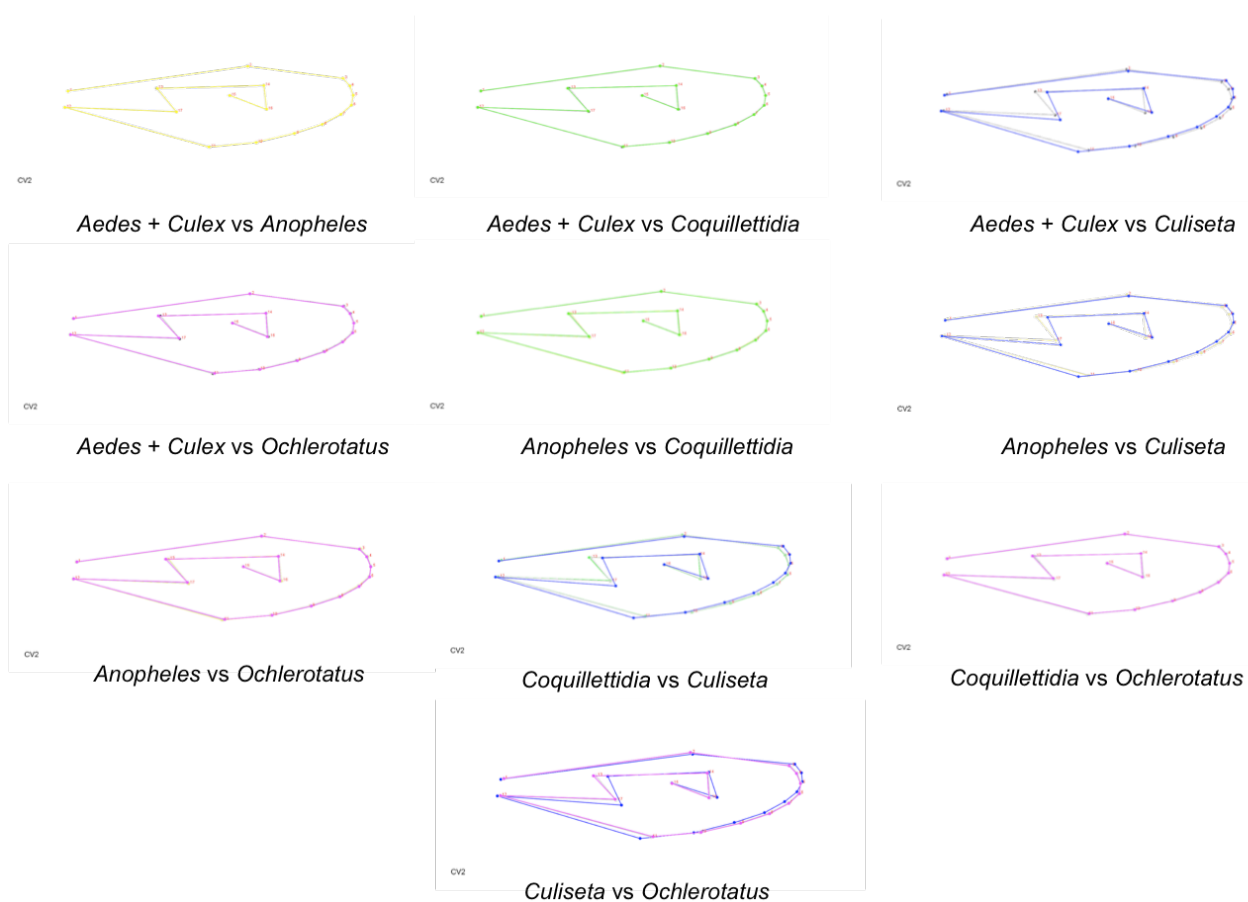
Slika 6. Projekcija komarjev iz šestih rodov vzdolž prvih štirih diskriminacijskih osi (*Canonical variate*) ob upoštevanju koordinat za 17 LM.

V tej analizi razlik med rodovoma *Aedes* in *Culex* posebej ne navajamo, saj vzdolž prve in druge osi med njima ni jasne ločitve (Slika 6). Vzdolž prve diskriminacijske osi je odstopanje najbolj opazno v primerjavi rodu *Anopheles* z ostalimi rodovi (Slika 6, 7). Krila tega rodu so v primerjavi z drugimi ožja. Krila rodu *Culiseta* in *Ochlerotatus* so na podlagi LM največja oz. najširša ter so si med sabo z izjemo para *Aedes*–*Culex* tudi najbolj podobna. Najbolj vidne razlike opazimo pri 14. in 16. LM (Slika 7), kjer je 14. LM pri rodovih *Coquillettidia*, *Culiseta* in *Ochlerotatus* pomaknjen v desno in 16. LM v levo, medtem ko je pri rodovih *Culex*, *Aedes* in *Anopheles* ravno obratno. Opazna je tudi razlika v postavitvi 13. in 17. LM, katera sta pri rodovih *Anopheles*, *Aedes* in *Culex* bližje skupaj, pri ostalih pa bolj odmaknjena eden od drugega (Slika 7).



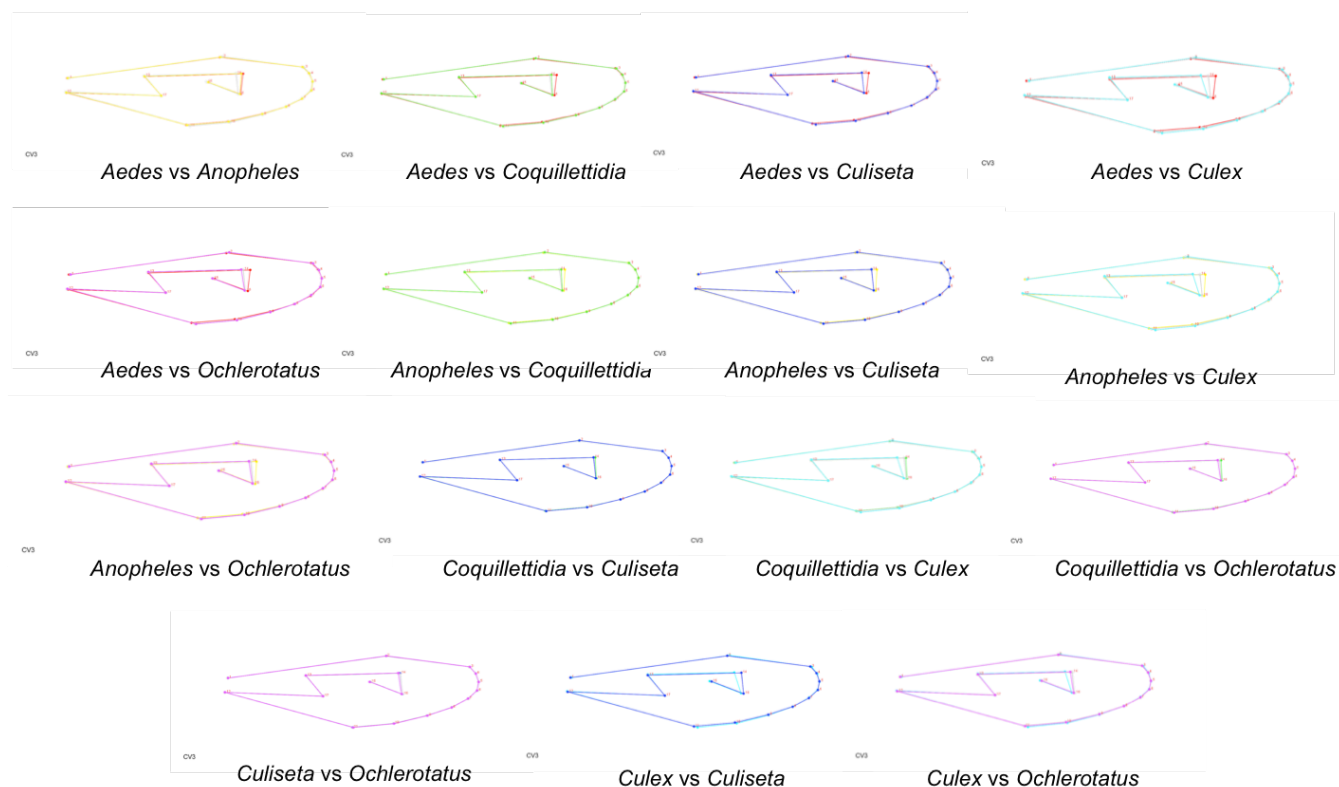
Slika 7. Variabilnost oblike prikazana z wireframe grafi za prvo komponento diskriminacijske analize (CV1) za vseh šest rodov (črna - *Aedes + Culex*, rumena - *Anopheles*, zelena - *Coquillettidia*, modra - *Culiseta*, roza - *Ochlerotatus*).

Vzdolž druge osi se rodova *Aedes* in *Culex* skoraj popolnoma ujemata z rodovi *Anopheles*, *Coquillettidia* in *Ochlerotatus*, prav tako pa je vidno skoraj popolno prekrivanje rodu *Anopheles* z rodovoma *Coquillettidia* in *Ochlerotatus* ter rodu *Coquillettidia* z rodom *Ochlerotatus*. Najbolj očitno se od ostalih vzdolž druge osi loči rod *Culiseta* (Sliki 6, 8). Najbolj očitne razlike so v 13., 14., 16. in 17. LM (Slika 9).



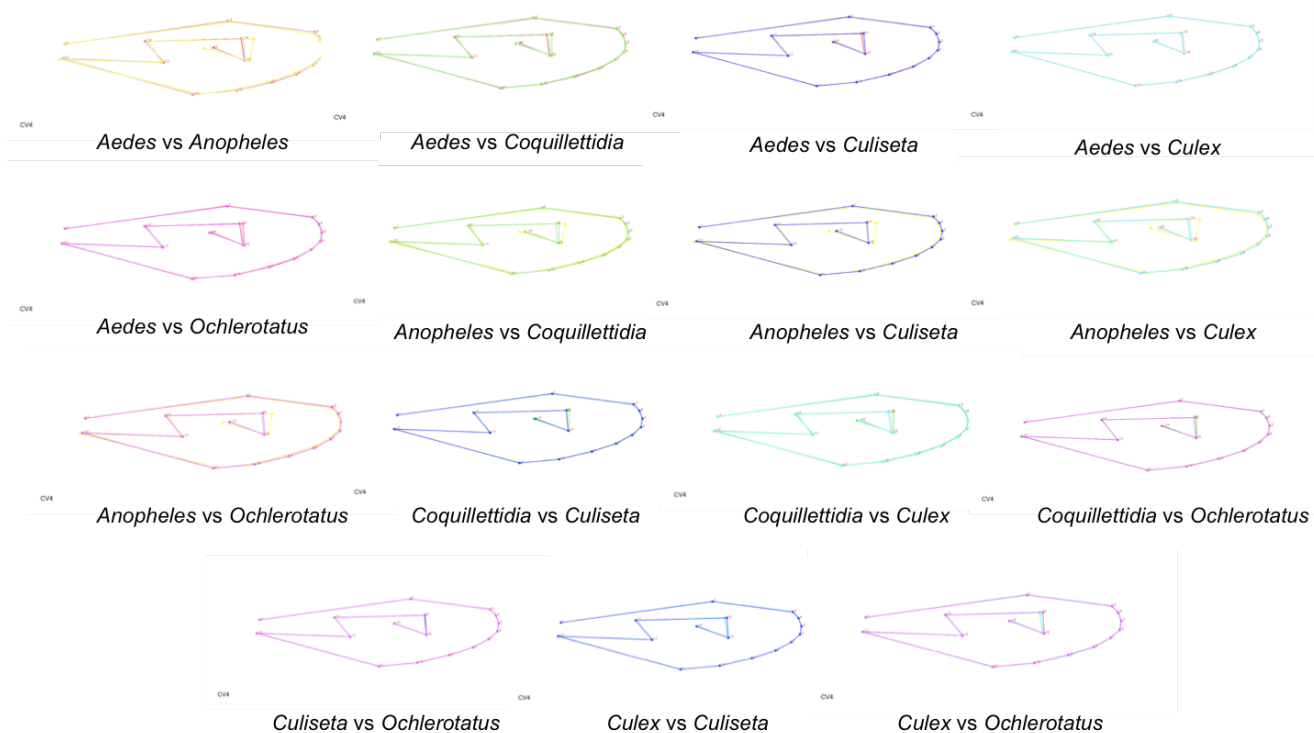
Slika 8. Variabilnost oblike prikazana z wireframe grafi za drugo komponento diskriminacijske analize (CV2) za vseh šest rodov (črna - *Aedes + Culex*, rumena - *Anopheles*, zelena - *Coquillettidia*, modra - *Culiseta*, roza - *Ochlerotatus*).

Na podlagi analize vzdolž tretje osi se rodovi med sabo ločijo predvsem na podlagi 14. in 16. LM (Slika 9). Tukaj tudi končno opazimo razliko med rodovoma *Aedes* in *Culex*, ki imata ta dva LM, predvsem pa LM 14, najbolj očitno oddaljena. Prav tako je ta razdalja precej velika v primerjavi rodov *Anopheles* in *Culex*. Manj očitna razlika se opazi tudi v LM 11, kateri je pri rodovih *Aedes* in *Anopheles* pomaknjen malenkost bolj levo in višje (Preglednica 5, Sliki 6, 9).



Slika 9. Variabilnost oblike prikazana z wireframe grafi za tretjo komponento diskriminacijske analize (CV3) za vseh šest rodov (črna - *Aedes* + *Culex*, rumena - *Anopheles*, zelena - *Coquillettidia*, modra - *Culiseta*, roza - *Ochlerotatus*).

Vzdolž četrte osi se od ostalih rodov najbolj loči rod *Anopheles* (Slika 6), kar je lepo razvidno in zopet prikazano pretežno s 14. LM (Preglednica 5, Slika 10). Rodova *Aedes* in *Culex* se popolnoma prekrivata, prav tako, z minimalno razliko v LM 14, tudi *Culiseta* in *Ochlerotatus*. V primerjavi z ostalimi rodovi ima rod *Anopheles* LM 2-10 postavljene bolj proti centru krila, medtem ko ima 12. LM rahlo bolj oddaljen od centra krila (Preglednica 5, Slika 10).



Slika 10. Variabilnost oblike prikazana z wireframe grafi za četrto komponento diskriminacijske analize (CV4) za vseh šest rodov (črna - *Aedes* + *Culex*, rumena - *Anopheles*, zelena - *Coquillettidia*, modra - *Culiseta*, roza - *Ochlerotatus*).

Za pripadnike posameznih rodov smo na podlagi izmerjenih sedemnajstih LM napovedali odstotek živali, ki se uvrstijo v sebi lastno skupino (Preglednica 5). Brez prečnega preverjanja je bil odstotek pravilno uvrščenih živali 94,3 %, v postopku prečnega preverjanja pa 84,0 %. Od tega je bila napoved uvrstitve brez prečnega preverjanja vedno pravilna za rodove *Anopheles*, *Coquillettidia* in *Culiseta*. *Anopheles* in *Culiseta* tudi v prečnem preverjanju ostaneta brez v drug rod uvrščenih živali, medtem ko se v prečnem preverjanju tri živali iz rodu *Coquillettidia* uvrstijo v drugi rod (od tega dve v rod *Ochlerotatus* in ena v rod *Aedes*). Pravilnost uvrstitev brez prečnega preverjanja za druge rodove ni popolna: za rod *Aedes* 97,6 % (ena žival se uvrsti v rod *Culex*), za rod *Ochlerotatus* 95,0 % (ena žival se uvrsti v rod *Culex*) ter za rod *Culex* 87,5 % (štiri živali se uvrstijo v rod *Aedes*). V prečnem preverjanju se za slednje tri rodove napoved pravih uvrstitev še nekoliko zmanjša: v rodu *Ochlerotatus* ostane 90 % pravilno uvrščenih živali (po ena žival pa se uvrsti med predstavnike rodov *Culex* in *Coquillettidia*), v rodu *Aedes* 85,4 % (pet živali iz tega rodu se uvrsti v rod *Culex* in ena v rod *Anopheles*).

Da bi zmanjšali število znakov, smo diskriminacijsko analizo ponovili še s postopno (stepwise) metodo. V tem primeru je za 90,6 % pravilno uvrstitev brez prečnega preverjanja oz. 82,1 % z njim, bilo potrebno upoštevati le 11 LM (x4, x6, x8, x11, x14, x15, x16; y8, y9, y13, y17). V tem primeru so odstotki pravih uvrstitev za posamezne

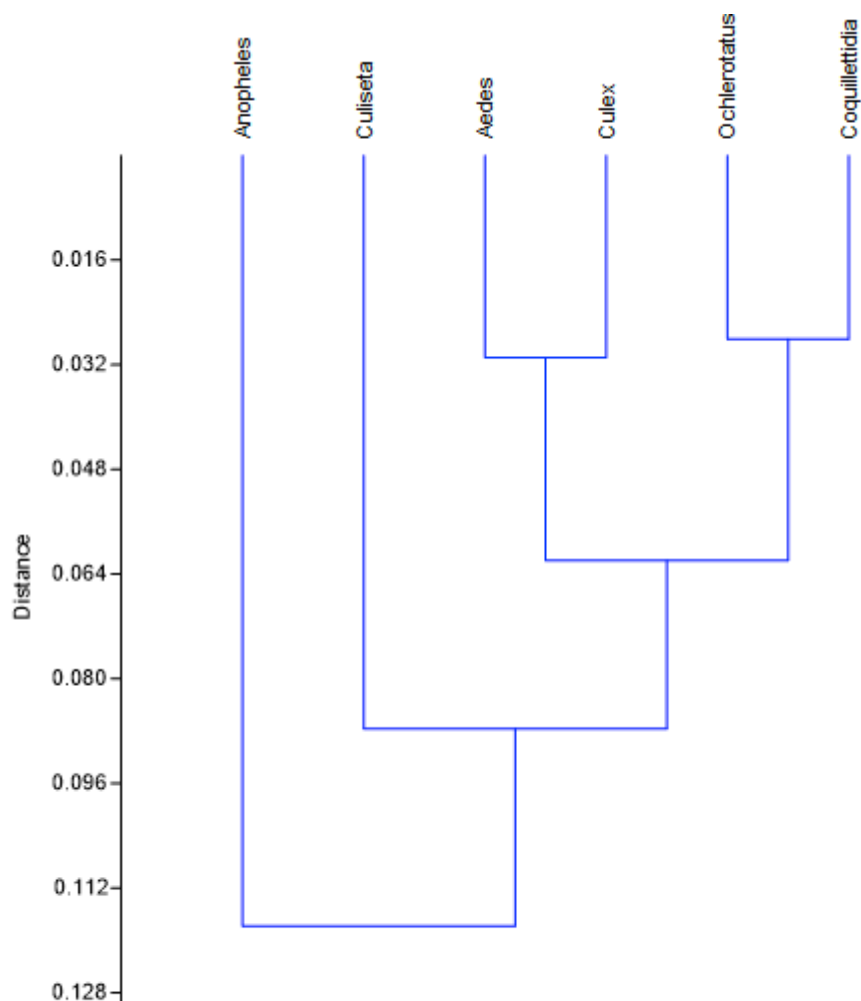
rodove znašali: (1) brez prečnega preverjanja – za *Aedes* 97,6 % (ena žival se uvrsti v *Culex*), za *Ochlerotatus* 95 % (ena žival se uvrsti v *Culex*), za *Culex* 87,5 % (štiri živali se uvrstijo v *Aedes*), za preostale tri rodove (*Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culiseta*) pa napačnih uvrstitev ni bilo: (2) s prečnim preverjanjem 84,0 % pravih uvrstitev – za *Aedes* 85,4 % (štiri živali se uvrstijo v *Culex*), za *Ochlerotatus* 90,0 % (po ena žival se uvrsti v rodova *Culex* in *Coquillettidia*), za *Culex* 81,3 % (šest živali se uvrsti v *Aedes*), za *Coquillettidia* le 40 % (dve živali se uvrstita v *Ochlerotatus*, ena v *Aedes*), za preostala dva rodova (*Anopheles*, *Culiseta*) pa živali, uvrščenih v drugi rod, ni.

Mahalanobisove razdalje med pari rodov (Preglednica 5) se gibljejo med vrednostmi 144,2 za par *Anopheles* – *Culiseta* in 35,3 za par *Culex* – *Aedes*. V povprečju je od vseh ostalih rodov oddaljen rod *Anopheles* (povp. Mahalanobisova razdalja znaša 111,1), sledijo mu *Culiseta* (109,5), *Ochlerotatus* (80,5), *Coquillettidia* (76,7) ter tesno skupaj še *Aedes* (69,6) in *Culex* (69,5). Vsi pari rodov so se v Mahalanobisovi razdalji statistično značilno razlikovali (permutacijski test, $p < 0,05$).

Preglednica 5. Mahalanobisove razdalje med pari rodov pogostih vrst komarjev v Sloveniji ter povprečna oddaljenost vsakega rodu od vseh ostalih.

	<i>Aedes</i>	<i>Anopheles</i>	<i>Coquillettidia</i>	<i>Culex</i>	<i>Culiseta</i>	<i>Ochlerotatus</i>
<i>Anopheles</i>	87,6					
<i>Coquillettidia</i>	58,0	107,7				
<i>Culex</i>	35,3	90,7	59,4			
<i>Culiseta</i>	101,9	144,2	104,3	100,5		
<i>Ochlerotatus</i>	65,2	125,4	54,0	61,6	96,4	
Povprečna oddaljenost	69,6	111,1	76,7	69,5	109,5	80,5

V analizi kopičenja z Wardovo metodo (kofenetski korelacijski koeficient znaša 0,89) smo potrdili ločitev obeh poddružin Anophelinae in Culicidae, ki se združita na razdalji okoli 0,12 (Slika 11). Vendar topologija rodov znotraj poddružine Culicinae ne odseva filogenetske sorodnosti (primerjaj s Sliko 1), kot jo predvidevajo molekulske analize komarjev iz družine Culicidae (Reidenbach in sod. 2009).



Slika 11. Analiza kopičenja za šest pogostih vrst komarjev v Sloveniji z Wardovo metodo. Uporabljenih je bilo 17 LM.

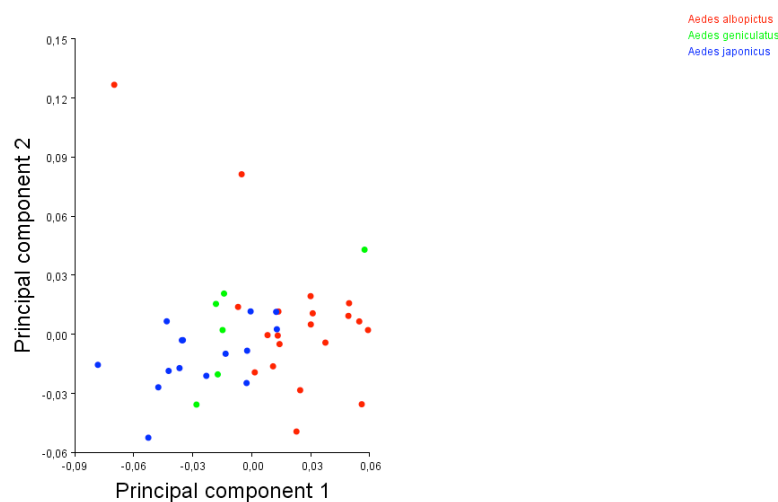
3.1.2.2 Znotrajrodovna variabilnost in medvrstne razlike

3.1.2.2.1 Rod *Aedes*

V analizi glavnih komponent 30 glavnih komponent razloži celotno variabilnost 17 LM, izmerjenih pri treh vrstah znotraj rodu *Aedes*. Prvih osem glavnih komponent razloži več kot 90 % skupne variabilnosti podatkov, od tega prvi pripada 35,2 % in drugi nadaljnjih 27,4 % skupne variabilnosti podatkov (Preglednica 6). Jasne ločitve med tremi vrstami ni, postop vzdolž prve komponente se začne na levi z *Ae. japonicus* ter se nadaljuje preko *Ae. geniculatus* do *Ae. albopictus* (Slika 12).

Preglednica 6. Rezultati analize glavnih komponent za tri vrste znotraj rodu *Aedes*; seznam prvih osmih funkcij (PC) z lastnimi vrednostmi, odstotki pojasnjene variance in kumulativni odstotki.

PC	Lastna vrednost	% pojasnjene variance	Kumulativni %
1	0,00125616	35,162	35,162
2	0,00098046	27,445	62,607
3	0,00035306	9,883	72,489
4	0,00020512	5,742	78,231
5	0,00015610	4,369	82,601
6	0,00013533	3,788	86,389
7	0,00009989	2,796	89,185
8	0,00008549	2,393	91,578

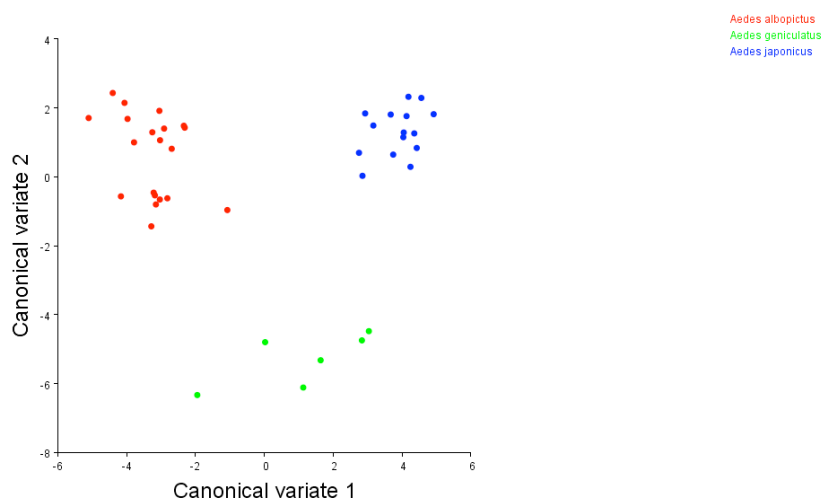


Slika 12. Projekcija treh vrst komarjev iz rodu *Aedes* vzdolž prvih dveh primarnih komponent (*Principal component*) ob upoštevanju koordinat za 17 LM.

V diskriminacijski analizi prva os pojasni 68,7 % skupne variabilnosti podatkov, druga os pa preostanek. Obe osi prispevata k ločevanju treh vrst ($p < 0,07$): medtem ko se *Ae. albopictus* in *Ae. japonicus* medsebojno jasno ločita že vzdolž prve osi, se *Ae. geniculatus*, ki ima vmesne vrednosti med obema vzdolž prve osi, jasno loči od obeh drugih vrst vzdolž druge osi (Slika 13).

Preglednica 7. Rezultati diskriminacijske analize za vse tri vrste rodu *Aedes*; seznam vseh diskriminacijskih funkcij (DF) z lastnimi vrednostmi, odstotki pojasnjene variance, kumulativni odstotki in signifikanco.

DF	Lastna vrednost	% pojasnjene variance	Kumulativni %	Sig.
1	11,63421424	68,696	68,696	0,001
2	5,30168486	31,304	100,000	0,066



Slika 13. Projekcija treh vrst komarjev iz rodu *Aedes* vzdolž prvih dveh diskriminacijskih osi (*Canonical variate*) ob upoštevanju koordinat za 17 LM.

Vzdolž prve osi so najbolj opazne razlike razvidne med vrstama *Ae. geniculatus* in *Ae. japonicus*, predvsem v LM 2, 14, 16 in 17 (Slika 14). Precej podobna sta si *Ae. albopictus* in *Ae. japonicus*, razlike so opazne v LM 14, 16 in 17, kjer so LM *Ae. albopictus* pomaknjeni rahlo v desno za razliko od *Ae. japonicus*. V primerjavi vseh treh vrst med sabo ima LM 2 različno postavitev, pri *Ae. geniculatus* je ta postavljen bolj v levo, pri *Ae. japonicus* v desno, medtem ko je pri *Ae. albopictus* ravno nekje vmes.



Ae. albopictus vs *Ae. geniculatus*



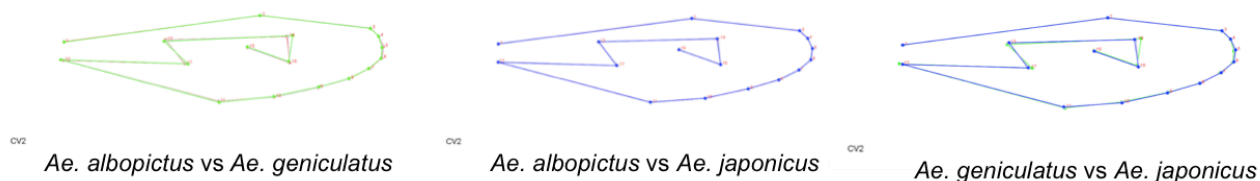
Ae. albopictus vs *Ae. japonicus*



Ae. geniculatus vs *Ae. japonicus*

Slika 14. Variabilnost oblike prikazana z wireframe grafi za prvo komponento diskriminacijske analize (CV1) za vse tri vrste rodu *Aedes* (rdeča = *Ae. albopictus*, zelena = *Ae. geniculatus*, modra = *Ae. japonicus*).

Vzdolž druge osi se *Ae. albopictus* in *Ae. japonicus* skoraj popolnoma prekrivata (Slika 13). *Ae. geniculatus* se na podlagi druge komponente razvidno loči od ostalih dveh vrst, kar tudi dokazujejo wireframe grafi in sicer predvsem v LM 5, 13, 14, 16 in 17 (Slika 15).



Slika 15. Variabilnost oblike prikazana z wireframe grafi za drugo komponento diskriminacijske analize (CV2) za vse tri vrste rodu *Aedes* (rdeča = *Ae. albopictus*, zelena = *Ae. geniculatus*, modra = *Ae. japonicus*).

Za vrste, ki spadajo v rod *Aedes*, smo na podlagi izmerjenih sedemnajstih LM napovedali odstotek živali, ki se uvrstijo v sebi lastno skupino. Brez prečnega preverjanja je bil odstotek pravilno uvrščenih živali 100,0 %, v postopku prečnega preverjanja pa le 53,7 %. V postopku prečnega preverjanja uvrstitve niso bile tako pravilne: za vrsto *Ae. albopictus* 50,0 % (pet živali se uvrsti v vrsto *Ae. geniculatus* in pet v vrsto *Ae. japonicus*), za vrsto *Ae. geniculatus* 33,3 % (dve živali se uvrstita v vrsto *Ae. albopictus* ter prav tako dve v vrsto *Ae. japonicus*) ter za vrsto *Ae. japonicus* 66,7 % (tri živali se uvrstijo v vrsto *Ae. albopictus* in dve v vrsto *Ae. geniculatus*).

Da bi zmanjšali število znakov, smo diskriminacijsko analizo ponovili še s postopno (stepwise) metodo. V postopku brez prečnega preverjanja je bil odstotek pravilno uvrščenih živali 97,6 %, v postopku prečnega preverjanja pa 95,1 %. V postopku brez prečnega preverjanja so odstotki pravilnih uvrstitev za posamezne vrste znašali: za *Ae. albopictus* 95,0 % (ena žival se uvrsti v vrsto *Ae. japonicus*), medtem ko sta uvrstitvi za ostali dve vrsti 100,0 %. V postopku prečnega preverjanja je uvrstitev v vrsto *Ae. geniculatus* 100,0 %, za *Ae. albopictus* 95,0 % (zopet se ena žival uvrsti v vrsto *Ae. japonicus*) ter za *Ae. japonicus* 93,3 % (ena žival se uvrsti v vrsto *Ae. geniculatus*).

Mahalanobisove razdalje med pari treh vrst so v primerjavi z razdaljami med rodovi bistveno manjše (Preglednica 8). Permutacijski test pokaže, da je le razdalja med *Ae. japonicus* in *Ae. albopictus* (0,0532) statistično značilna ($p < 0,001$; ostala dva para: $p > 0,05$).

Preglednica 8. Mahalanobisove razdalje med pari treh vrst iz rodu *Aedes*.

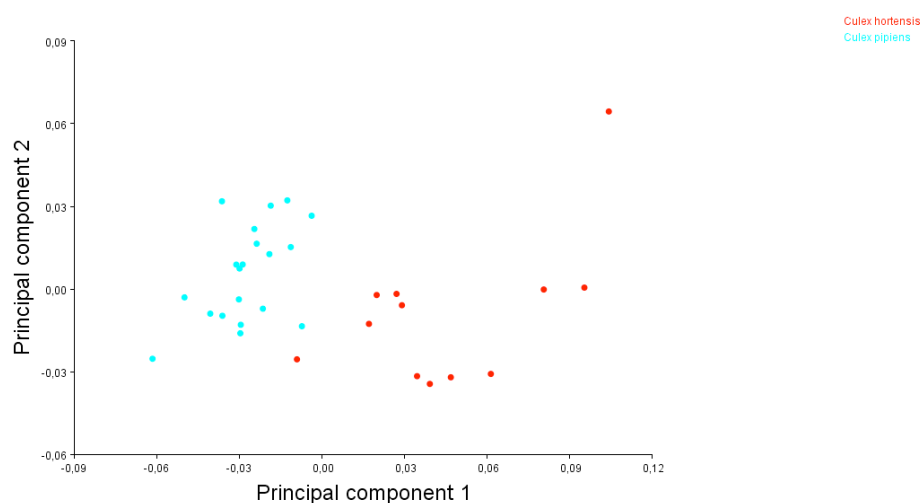
	<i>Aedes albopictus</i>	<i>Aedes geniculatus</i>
<i>Aedes geniculatus</i>	0,0332	
<i>Aedes japonicus</i>	0,0532	0,0343

3.1.2.2.2 Rod *Culex*

Že v analizi glavnih komponent se obe vrsti iz rodu *Culex* na projekciji vzdolž prvih dveh glavnih komponent navkljub nakazanemu postopu vzdolž prve glavne komponente skorajda ne prekrivata (Slika 16). Prva glavna komponenta pojasni 55,45 %, druga pa 15,51 % skupne variabilnosti podatkov. Prvi šest od skupaj 30 osi pojasni več kot 90 % skupne variabilnosti podatkov (Preglednica 9).

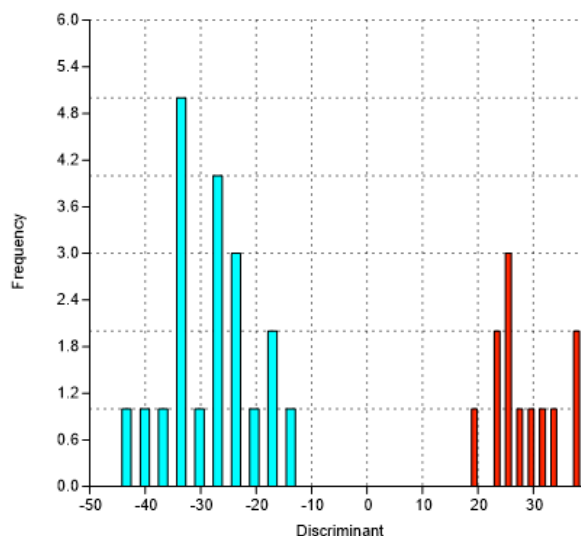
Preglednica 9. Rezultati analize glavnih komponent za dve vrsti rodu *Culex*; seznam prvih šestih funkcij (PC) z lastnimi vrednostmi, odstotki pojasnjene variance in kumulativni odstotki.

PC	Lastna vrednost	% Variance	Kumulativni %
1	0,00180721	55,450	55,450
2	0,00050557	15,512	70,962
3	0,00025667	7,875	78,837
4	0,00019628	6,022	84,859
5	0,00011129	3,415	88,274
6	0,00009431	2,894	91,168



Slika 16. Projekcija dveh vrst komarjev iz rodu *Culex* vzdolž prvih dveh primarnih komponent (*Principal component*) ob upoštevanju koordinat za 17 LM.

V diskriminacijski analizi s postopno metodo in upoštevanimi 10 znaki, kjer le ena os pojasni vso variabilnost podatkov, se obe vrsti jasno ločita (Slika 17).

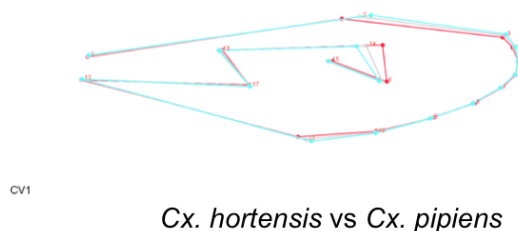


Slika 17. Diskriminacijska analiza dveh vrst rodu *Culex* (rdeča = *Cx. hortensis*, modra = *Cx. pipiens*).

Preglednica 10. Rezultati diskriminacijske analize s statistično pomembnimi LM in njihovimi prispevki.

	DF
x2	-645.99
y2	1215.1
x3	-554.91
y3	-1678.3
x4	-779.95
x9	-331.02
x11	-57.874
x14	625.55
x15	-94.614
x16	-912.94

LM 2, 3, in 11 so pri *Cx. pipiens* pomaknjene v desno, kar pomeni večjo širino krila, medtem ko so osrednje LM (14, 15 in 16) pomaknjene bolj v levo. Ostale LM se dokaj prekrivajo (Slika 18).



Slika 18. Variabilnost oblike prikazana z wireframe grafom za prvo komponento diskriminacijske analize (CV1) za dve vrsti rodu *Culex* (rdeča = *Cx. hortensis*, modra = *Cx. pipiens*).

Za pripadnike dveh vrst rodu *Culex* smo na podlagi izmerjenih sedemnajstih točk napovedali odstotek živali, ki se uvrstijo v sebi lastno skupino (Preglednica 10). Rezultati so pokazali 100,0 % ločitev med obema vrstama, kar velja za postopek brez prečnega ter prav tako za postopek s prečnim preverjanjem.

3.2 Diskusija

3.2.1 Morfološka variabilnost na ravni rodov

Glede na to, da naša naloga temelji na samicah komarjev, je vredno omeniti, da imajo samice povprečno večja krila kakor samci (Jirakanjanakit in sod. 2008). Velik vpliv na velikost ima količina hranil, ki jih komarji pridobijo v razvijajočem se stadiju, stadiju ličinke (Briegel in sod. 2000). Ličinke, ki imajo na voljo več hranil, so večje, posledično pa so tudi v odrasli dobi večje. Večje samice imajo prednost pred manjšimi, saj lahko letijo več časa, imajo višjo stopnjo preživetja, povečano zmožnost lociranja gostitelja ter večji prevzem krvi in ostalih nutrientov (Briegel in sod. 2000) (Nasci 1991). Iz tega lahko tudi sklepamo, da imajo večje samice večji vektorski potencial (Nasci 1991) ter večji potencial shranjevanja nutrientov (Briegel in sod. 2000).

Pred pričetkom dela smo si zastavili štiri hipoteze. V prvi smo predpostavljali, da so taksoni različno veliki in izkazujejo različno stopnjo variabilnosti, kar smo z analizami tudi potrdili. Znotraj poddružine Culicinae ima rod *Culiseta* največjo velikost kril (največja velikost centroida). Najmanjšo vrednost velikosti centroida in s tem dokazano najmanjša krila ima rod *Ochlerotatus*. Rezultati znotraj rodu *Aedes* so prikazali *Ae. geniculatus* z največjimi krili in *Ae. albopictus* z najmanjšimi. Znotraj rodu *Culex* ima *Cx. pipiens* rahlo večja krila kakor druga vrsta *Cx. hortensis*. Rodovi *Aedes*, *Ochlerotatus* in *Culex* z večjim številom vrst in vzorčenih živali so prikazali največjo variabilnost, medtem ko so ostali, *Coquillettidia*, *Culiseta* in *Anopheles*, z eno vrsto in manj živalmi, prikazali manjšo. Manjša variabilnost kril je lahko rezultat dejanskega stanja, ali pa odsev manjšega števila vzorcev omenjenih taksonov. Analiza velikosti centroida znotraj rodu *Aedes* je prikazala

Ae. geniculatus z največjo velikostjo kril, sledi mu *Ae. japonicus* ter v velikosti kril najmanjši *Ae. albopictus*. Znotraj rodu *Culex* je *Cx. pipiens* z 20 vzorčenimi živalmi nekoliko večji a manj variabilen od *Cx. hortensis*, čeprav smo pri tej vrsti imeli le 12 vzorčenih živali.

Pomembno je omeniti, da je razvejanost žil v krilih rodovno in vrstno specifična ter kljub variabilnosti vrst pomaga ločevati med taksoni. Pri rezultatih analize glavnih komponent nam večino variabilnosti pojasni prva komponenta, ki skupaj z drugo kaže na zvezno prehajanje med rodovi. Pri analizi glavnih komponent ni tako jasna ločitev taksonov, kakršno smo dobili z rezultati diskriminacijske analize. Pri tej analizi nam vsaka os statistično loči posamezni rod od ostalih. Prvo se od ostalih loči rod *Anopheles*, s čimer smo dokazali pripadnost dvema ločenima poddružinama Anophelinae in Culicinae. Prav tako se vzdolž prve osi loči rod *Ochlerotatus* od rodov *Aedes* in *Culex*. Naslednja se opazno ločita rodova *Aedes* in *Culex*, na koncu pa se loči od ostalih še rod *Coquillettidia*, kar pojasnjuje majhno variabilnost, vendar je razlog za to po vsej verjetnosti majhno število vzorčenih živali. Najbolj variabilni LM so pri vseh taksonih notranji LM (13.-17.), ki večinoma odstopajo v desno in levo smer, torej so postavitve notranjih žil (trahej) na krilih precej raznolike. Taksoni se z diskriminacijsko analizo, ne glede na število vrst ali število živali, očitno ločijo med sabo. Uspeh ločitev je z 90 % precej dober, vendar je potrebno upoštevati, da je na nivoju rodov ločitev boljša kakor na nivoju vrst, saj so si vrste med sabo manj raznolike kakor širše gledano rodovi. S tem smo potrdili četrto hipotezo, kjer smo predvidevali, da so morfološke razdalje večje med rodovi kot med vrstami, kar je skladno s filogenijo.

Podobnost med vrstami smo ugotavljali tudi z Mahalanobisovimi razdaljami, katere so nam ponovno prikazale veliko podobnost med rodovoma *Culex* in *Aedes*, kar je razvidno tudi iz analize kopičenja (Slika 11), kjer sta rodova prikazana kot najbolj sorodna, medtem ko se je rod *Ochlerotatus* zopet znatno ločil od rodu *Aedes*. Sorodnost rodov *Aedes* in *Culex*, kakor so jo prikazali naši rezultati, ne odseva filogenetske sorodnosti (Slika 1). Dodaten dokaz ločenih poddružin Anophelinae in Culicinae je očitna ločitev rodu *Anopheles* od ostalih.

V analizi kopičenja smo zopet potrdili ločitev poddružin Anophelinae in Culicinae. V poddružini Culicinae se prvo loči rod *Culiseta* od ostalih štirih, naprej pa se ločita dva sklopa: *Aedes* - *Culex* in *Ochlerotatus* - *Coquillettidia*.

3.2.2 Morfološka variabilnost na ravni vrst

Analiza glavnih komponent za rod *Aedes* ne prikaže jasne ločitve med tremi obravnavanimi vrstami. *Ae. albopictus* in *Ae. japonicus* sta vzdolž prve komponente (Slika 12) dokaj ločena, medtem ko je *Ae. geniculatus* ravno med njima. Diskriminacijska analiza dokazuje jasno ločitev vseh treh vrst iz rodu *Aedes*, kar pomeni, da so bile meritve uspešne in dobljeni podatki pravilni. Večja podobnost v obliki kril se opazi pri vrstah *Ae. albopictus* in *Ae. japonicus*, medtem ko *Ae. geniculatus* malo bolj odstopa. Vse tri vrste se očitno razlikujejo v postavitvi 2. LM, ki je meja zgornjega dela kril.

Mahalanobisove razdalje med vrstami rodu *Aedes* so znatno nižje v primerjavi z med rodovnimi, kar je povsem pravilno, saj so si vrste znotraj istega rodu podobnejše kakor vrste pripadajoče različnim rodovom.

Z analizo glavnih komponent se vrsti *Cx. pipiens* in *Cx. hortensis* skorajda ne prekrivata, ločitev je še vedno več kot očitna. Z diskriminacijsko analizo pa se vrsti jasno ločita, brez kakršnega koli prekrivanja, kar pojasnjuje kvaliteto podatkov in dovoljšnjo variabilnost med obravnavanima vrstama. Na podlagi LM smo ugotovili, da ima *Cx. pipiens* rahlo širša krila kakor *Cx. hortensis*.

Pri analizi kopičenja pravičen filogenetski položaj prikazuje le rod *Anopheles* medtem ko topologija drevesa znotraj poddružine Culicinae ne odlikava dejanske filogenetske sorodnosti. Ostali ne odražajo sorodnosti, kakor jo prikazujejo Reidenbach in sod. (2009). *Ochlerotatus* je na podlagi naše analize sorodnejši rodu *Coquillettidia*, medtem ko bi moral biti bližje rodu *Aedes*. Prav tako bi moral biti rod *Culex* bližje rodu *Culiseta*, vendar je na podlagi naše analize bližje rodu *Aedes*. Rod *Coquillettidia* je praviloma bližjesoroden rodu *Ochlerotatus*, vendar bi moral zraven spadati tudi rod *Aedes*, katerega naša analiza tako ni prikazala, zato povzemamo, da topologija taksonov v analizi kopičenja na osnovi morfoloških podatkov ne odseva filogenetskega položaja skupin in s tem zavračamo tretjo hipotezo.

Z diskriminacijsko analizo so nam rezultati pravilno ločili rodove med sabo, prav tako tudi vrste znotraj rodov *Culex* in *Aedes*, kar pomeni, da je metoda geometrijske morfometrije zanesljivo orodje za prepoznavanje taksonov komarjev na morfološki osnovi.

4 ZAKLJUČEK

V zaključni nalogi smo ugotovili, da je največji rod *Culiseta*, najmanjši pa *Ochlerotatus*. Visoko variabilnost velikosti kril so pokazali rodovi *Aedes*, *Ochlerotatus* in *Culex*, po vsej verjetnosti zaradi večjega števila analiziranih vrst v rodovih *Aedes* (3) in *Culex* (2) ter večjega števila vzorčenih živali. Ostali rodovi so pokazali manjšo variabilnost velikosti kril. Razlike so statistično značilne, kar pomeni, da smo z geometrijsko morfometrijo ugotovili, da se obravnavani taksoni razlikujejo v velikosti in izkazujejo različno stopnjo variabilnosti.

Rod *Ochlerotatus* se očitno loči od rodu *Aedes* že vzdolž prve diskriminacijske osi ter tudi na podlagi Mahalanobisovih razdalj, kar lahko nakazuje, da si *Ochlerotatus* (po nekaterih avtorjih le podrod (Reinert 2000)) zasluži status ločenega rodu znotraj *Aedes*.

Pri analizi rodov, predvsem pa diskriminacijski analizi, se rodovi očitno ločijo med sabo, ne glede na število vključenih vrst ali število vzorčenih živali. Očitna ločitev se je vedno najprej pojavila s poddružinama Anophelinae in Culicinae, prav tako tudi pri analizi kopičenja. Pri med vrstni analizi so se vse vrste obeh rodov (*Aedes* in *Culex*) med sabo ločile in ne prekrivale, s čimer so nam rezultati potrdili, da je geometrična morfometrija zanesljivo orodje za prepoznavanje taksonov komarjev na morfološki osnovi.

Dokaz, da so Mahalanobisove razdalje med vrstami rodu *Aedes* manjše, kakor razdalje med posameznimi rodovi nam pove, da so morfološke razdalje večje med rodovi kakor med vrstami, kar je povsem skladno s filogenijo.

Z raziskovalnim delom smo ugotovili, da je določanje s pomočjo geometrijske morfometrije uporabna metoda za določanje vrst komarjev in se jo lahko aplicira tudi na druge vrste. Vsekakor velja v prihodnosti izvesti dodatne raziskave in vključiti večje število vzorcev ter še druge vrste, zato da bo slika o ločitvi med posameznimi rodovi in vrstami jasnejša.

5 LITERATURA IN VIRI

A Glossary for Geometric Morphometrics. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/glossary/gloss1.html> (datum dostopa: 17.7.2018)

Becker N., Petrić D., Zgomba M., Boase C., Madon M., Dahl C., Kaiser A. 2010. Mosquitoes and Their Control. Berlin, Springer.

Bertone M.A., Courtney G.W., Wiegmann B.M. 2008. Phylogenetics and temporal diversification of the earliest true flies (Insecta: Diptera) based on multiple nuclear genes. *Systematic Entomology* 33: 678.

Borkent A. 1993. A world catalogue of fossil and extant Corethrellidae and Chaoboridae (Diptera), with a listing of references to keys, bionomic information and descriptions of each known life stage. *Insects Systematics & Evolution* 24(1): 1.

Briegel H., Knüsel I., Timmermann S.E. 2000. *Aedes aegypti*: size, reserves, survival and flight potential. *Journal of Vector Ecology* 26(1): 21-29.

Canisius College. <http://www3.canisius.edu/~sheets/IMP%208.htm> (datum dostopa: 24.7.2018)

Demirci B., Lee Y., Lanzaro G.C., Alten B. 2012. Altitudinal genetic and morphometric variation among populations of *Culex theileri* Theobald (Diptera: Culicidae) of northeastern Turkey. *Journal of Vector Ecology* 37(1): 197.

Dlugosch K.M., Parker I.M. 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* 17: 434-444.

Failloux A., Vazeille M., Rodhain F. 2002. Geographic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *Journal of Molecular Evolution* 55(6): 661.

Grimaldi D. Engel M.S. 2005. Diversity and Evolution. V: Grimaldi D. Engel M.S. (ur). *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press: 1-4.

Harbach R.E., Kitching I.J. 1998. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Systematic Entomology* 23: 351.

Jirakanjanakit N., Leemingsawat S., Dujardin J.P. 2008. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 420.

Jugovic J. 2010. Vrstna in rasna diferenciacija jamskih kozic *Troglocaris aggr. anophthalmus* (Crustacea: Decapoda: Atyidae) na Dinarskem krasu. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani.

Kalan K., Bužan V.E., Ivović V. 2014. Distribution of two invasive mosquito species in Slovenia in 2013. *Parasites & Vectors* 7(1): 9.

Kalan K., Šušnjar J., Ivović V., Bužan E. 2017. First record of *Aedes koreicus* (Diptera: Culicidae) in Slovenia. *Parasitology Research* 116(8): 2355.

Kamau L., Mukabana W.R., Hawley W.A., Lehmann T., Irungu L.W., Orago A.A.S., Collins F.H. 1999. Analysis of genetic variability in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* using microsatellite loci. *Insect Molecular Biology* 8(2): 294.

Klingenberg C.P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11: 353-357.

Laurito M., de Oliviera T.M.P., Almirón W.R., Sallum M.A.M. 2013. COI barcode versus morphological identification of *Culex* (*Culex*) (Diptera: Culicidae) species: a case study using samples from Argentina and Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108(1): 110.

Le Sueur D., Sharp B.L., Appleton C.C. 1992. Dark-scaled areas on adult *Anopheles* mosquitoes are selectively affected by temperature-related size variation. *Medical and Veterinary Entomology* 6: 398.

Lopez P.R., Mengual X. 2015. Mosquito species (Diptera: Culicidae) in three ecosystems from the Colombian Andes: identification through DNA barcoding and adult morphology. *Zookeys* 513: 51-53.

Lorenz C., Almeida F., Almeida-Lopes M., Louise C., Pereira S.N., Petersen V., Vidal P.O., Virginio P., Suesdek L. 2017. Geometric morphometrics in mosquitoes: What has been measured? *Infection, Genetics and Evolution* 54: 206-213.

Mattingly P.F. 1957. Genetical Aspects of the *Aedes aegypti* Problem I.–Taxonomy and Bionomics. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 51(4): 392.

Minard G., Tran F.H., Van V.T., Goubert C., Bellet C., Lambert G., Kim K.L.H., Thuy T.H.T., Mavingui P., Moro C.V. 2015. French invasive Asian tiger mosquito populations harbor reduced bacterial microbiota and genetic diversity compared to Vietnamese autochthonous relatives. *Frontiers in Microbiology* 6(970): 10-11.

Möhlmann T.W.R., Wennergren U., Tälle M., Favia G., Damiani C., Bracchetti L., Koenraad C.J.M. 2017. Community analysis of the abundance and diversity of mosquito species (Diptera: Culicidae) in three European countries at different latitudes. *Parasites & Vectors* 10: 510.

Mondal R., Devi N.P., Jauhari R.K. 2015. Landmark-based geometric morphometric analysis of wing shape among certain species of *Aedes* mosquitoes in district Dehradun (Uttarakhand), India. *Journal of Vector Borne Diseases* 52: 123.

Morphometrics at Suny Stony Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html> (datum dostopa: 24.7.2018)

Mosquito Magnet. <http://www.mosquitomagnet.com/advice/mosquito-info/biting-insect-library/culex-piapiens-mosquito> (datum dostopa: 16.7.2018)

Mosquito Taxonomic Inventory. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/8577> (datum dostopa: 16.7.2018)

Munstermann L.E., Conn J.E. 1997. Systematics of mosquito disease vectors (Diptera: Culicidae): Impact of Molecular Biology and Cladistic Analysis. *Annual Review of Entomology* 42: 352.

Nasci R. S. 1991. Influence of larval and adult nutrition on biting persistence in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 28(4): 524-526.

Nei M., Maruyama T., Chakraborty R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *International Journal of Organic Evolution* 29(1): 1-10.

Patsoula E., Samanidou-Voyadjoglou A., Spanakos G., Kremastinou J., Nasioulas G., Vakalis N.C. 2006. Molecular and Morphological Characterization of *Aedes albopictus* in

Northwestern Greece and Differentiation from *Aedes cretinus* and *Aedes aegypti*. *Journal of Medical Entomology* 43(1): 47-49.

Paupy C., Brengues C., Ndiath O., Toty C., Hervé J.P. Simard F. 2010. Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* in Niakhar, Senegal. *Infection, Genetics and Evolution* 10: 479.

Reidenbach K.R., Cook S., Bertone M.A., Harbach R.E., Wiegmann B.M., Besansky N.J. 2009. Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. *BMC Evolutionary Biology* 9:298.

Reinert J.F. 2000. New classification for the composite genus *Aedes* (Diptera: Culicidae: Aedini), elevation of subgenus *Ochlerotatus* to generic rank, reclassification of the other subgenera, and notes on certain subgenera and subspecies. *Journal of the American Mosquito Control Association* 16(3): 175-188.

Reinert J.F., Harbach R.E., Kitching I.J. 2004. Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zoological Journal of the Linnean Society* 142: 290.

Reinert J.F., Harbach R.E., Kitching I.J. 2006. Phylogeny and classification of *Finlaya* and allied taxa (Diptera: Culicidae: Aedini) based on morphological data from all life stages. *Zoological Journal of the Linnean Society* 148(1): 4.

Reinert J.F., Harbach R.E., Kitching I.J. 2008. Phylogeny and classification of *Ochlerotatus* and allied taxa (Diptera: Culicidae: Aedini) based on morphological data from all life stages. *Zoological Journal of the Linnean Society* 153(1): 31.

Rueda L.M. 2007. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 477-481.

Rueda L.M., Kim H., Klein T.A., Pecor J.E., Li C., Sithiprasasna R., Debboun M., Wilkerson R.C. 2006. Distribution and larval habitat characteristics of *Anopheles* Hyrcanus group and related mosquito species (Diptera: Culicidae) in South Korea. *Journal of Vector Ecology* 31(1): 199-200.

Statistics How To. <http://www.statisticshowto.com/mahalanobis-distance/> (datum dostopa: 17.7.2018)

Šušnjar J. 2016. Razširjenost slovenskih avtohtonih vrst komarjev v letu 2013. Zaključna naloga, Univerza na Primorskem.

Tovornik D. 1980. O ekologiji larvalnih komarjev v stoječi vodi izsuševalnega jarka na Ljubljanskem barju. V: Dodatne bio-ekološke raziskave o favni komarjev (Diptera: Culicidae) v Ljubljanski okolici. Zdravstveno varstvo: 19-30.

UTEP (University of Texas at El Paso) Biodiversity Collections. <https://www.utep.edu/leb/mosquito/adslide1.htm> (datum dostopa: 16.7.2018)

Versteirt V., Schaffner F., Garros C., Dekoninck W., Coosemans M., Van Bortel W. 2009. Introduction and establishment of the exotic mosquito species *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Belgium. Journal of Medical Entomology 46(6): 1466-:1467.

Vidal P.O., Peruzin M.C., Suesdek L. 2011. Wing diagnostic characters for *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae). Revista Brasileira de Entomologia 55(1): 134.

White B.J., Collins F.H., Besansky N.J. 2011. Evolution of *Anopheles gambiae* in Relation to Humans and Malaria. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 42: 111-114.

Wilke A.B.B., Christe R.O., Multini L.C., Vidal P.O., Wilk-da-Silva R., de Carvalho G.C., Marrelli M.T. 2016. Morphometric Wing Characters as a Tool for Mosquito Identification. Public Library of Science One 11(8): 2-8.

PRILOGE

PRILOGA A: Enosmerna analiza variance (ANOVA) za 17 LM in velikost centroida (CS) pri šestih rodovih pogostih komarjev v Sloveniji (signifikanca = 0,001).

Enosmerna analiza variance (ANOVA)					
	Vsota kvadratov	Stopinje prostosti (df)	Povprečni kvadrat	F	Sig.
x1	0.003	5	0.001	7.146	0.000
x2	0.013	5	0.003	3.167	0.011
y2	0.004	5	0.001	34.094	0.000
x3	0.002	5	0.000	8.516	0.000
y3	0.003	5	0.001	25.098	0.000
x4	0.001	5	0.000	10.517	0.000
y4	0.002	5	0.000	30.534	0.000
x5	0.000	5	0.000	6.096	0.000
y5	0.001	5	0.000	13.274	0.000
x6	0.001	5	0.000	6.849	0.000
y6	0.000	5	0.000	3.891	0.003
x7	0.001	5	0.000	6.152	0.000
y7	0.001	5	0.000	11.364	0.000
x8	0.002	5	0.000	11.646	0.000
y8	0.002	5	0.000	34.618	0.000
x9	0.002	5	0.000	7.324	0.000
y9	0.003	5	0.001	44.646	0.000
x10	0.003	5	0.001	8.788	0.000
y10	0.005	5	0.001	24.345	0.000
x11	0.013	5	0.003	10.659	0.000
y11	0.006	5	0.001	20.948	0.000
x12	0.001	5	0.000	2.695	0.025
x13	0.010	5	0.002	4.212	0.002
y13	0.001	5	0.000	22.189	0.000
x14	0.035	5	0.007	19.521	0.000
y14	0.001	5	0.000	14.313	0.000
x15	0.007	5	0.001	10.629	0.000
y15	0.001	5	0.000	10.496	0.000
x16	0.010	5	0.002	15.438	0.000
x17	0.004	5	0.001	5.213	0.000
y17	0.002	5	0.000	18.634	0.000
CS	32.225	5	6.445	11.734	0.000
	54.929	100	0.549		
	87.154	105			

PRILOGA B: Games-Howel in Post-hoc test med rodovi; standardna napaka (SE), statistična značilnost (Sig.) (prikazane le $p < 0,005$).

Primerjava šestih rodov

Odvisna spremenljivka		Povprečna razlika (I-J)	Standardna napaka (SE)	Sig.	95 % Interval zaupanja			
					Spodnja meja	Zgornja meja		
x1	<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	-,012953322000000*	0.0028	0.001	-0.0213	-0.0046	
		<i>Culex</i>	-,007364528200000*	0.0023	0.027	-0.0142	-0.0006	
	<i>Ochlerotatus</i>	<i>Coquillettidia</i>	,017510200000000*	0.0027	<0.001	0.0092	0.0258	
		<i>Anopheles</i>	,017094450000000*	0.0033	0.003	0.0060	0.0282	
	<i>Culex</i>	<i>Coquillettidia</i>	,011921406200000*	0.0022	<0.001	0.0051	0.0187	
		<i>Anopheles</i>	,011505656200000*	0.0029	0.034	0.0009	0.0221	
y1	<i>Ochlerotatus</i>	<i>Anopheles</i>	,0056917050*	0.0016	0.025	0.0006	0.0108	
x2	<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	-,022470950600000*	0.0066	0.015	-0.0420	-0.0029	
y2	<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	-,014978597900000*	0.0013	<0.001	-0.0190	-0.0110	
		<i>Culex</i>	-,004422442300000*	0.0013	0.011	-0.0081	-0.0007	
		<i>Culiseta</i>	-,009226432930000*	0.0015	0.006	-0.0151	-0.0033	
		<i>Anopheles</i>	,013009692100000*	0.0013	<0.001	0.0082	0.0178	
		<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culex</i>	,010556155600000*	0.0015	<0.001	0.0062	0.0149
		<i>Culiseta</i>	0.005752165000000	0.0016	0.057	-0.0002	0.0117	
		<i>Anopheles</i>	,027988290000000*	0.0015	<0.001	0.0229	0.0330	
		<i>Culex</i>	<i>Anopheles</i>	,017432134400000*	0.0014	<0.001	0.0125	0.0223
		<i>Coquillettidia</i>	<i>Anopheles</i>	,019158175000000*	0.0024	0.002	0.0095	0.0289
		<i>Culiseta</i>	<i>Anopheles</i>	,022236125000000*	0.0016	<0.001	0.0158	0.0287
	x3	<i>Aedes</i>	<i>Culex</i>	-,006834204270000*	0.0016	0.001	-0.0116	-0.0021
			<i>Culiseta</i>	-,012515829300000*	0.0016	<0.001	-0.0177	-0.0073
		<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culex</i>	-,008223025000000*	0.0016	<0.001	-0.0131	-0.0033
			<i>Culiseta</i>	-,013904650000000*	0.0016	<0.001	-0.0192	-0.0086
<i>Culex</i>		<i>Coquillettidia</i>	,010621375000000*	0.0023	0.022	0.0017	0.0195	
		<i>Culiseta</i>	-,005681625000000*	0.0015	0.021	-0.0106	-0.0008	
<i>Coquillettidia</i>		<i>Culiseta</i>	-,016303000000000*	0.0023	0.003	-0.0255	-0.0072	
y3		<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	-,0085275957*	0.0012	<0.001	-0.0120	-0.0050
			<i>Culiseta</i>	-,0119401957*	0.0011	<0.001	-0.0156	-0.0083
			<i>Anopheles</i>	,0156915543*	0.0010	<0.001	0.0126	0.0188
	<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culex</i>	,0088156125*	0.0012	<0.001	0.0054	0.0122	
		<i>Anopheles</i>	,0242191500*	0.0010	<0.001	0.0212	0.0272	
	<i>Culex</i>	<i>Culiseta</i>	-,0122282125*	0.0011	<0.001	-0.0158	-0.0086	
		<i>Anopheles</i>	,0154035375*	0.0010	<0.001	0.0124	0.0184	
	<i>Coquillettidia</i>	<i>Culiseta</i>	-,0084878050*	0.0015	0.009	-0.0143	-0.0026	
		<i>Anopheles</i>	,0191439450*	0.0014	<0.001	0.0133	0.0250	
		<i>Culiseta</i>	<i>Anopheles</i>	,0276317500*	0.0009	<0.001	0.0240	0.0313
x4	<i>Aedes</i>	<i>Culex</i>	-,003987195880000*	0.0011	0.012	-0.0074	-0.0006	
		<i>Culiseta</i>	-,010579164600000*	0.0015	0.007	-0.0170	-0.0042	
	<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culex</i>	-,005325931250000*	0.0014	0.007	-0.0096	-0.0010	
		<i>Culiseta</i>	-,011917900000000*	0.0017	0.001	-0.0181	-0.0057	
	<i>Culex</i>	<i>Culiseta</i>	-,006591968750000*	0.0016	0.036	-0.0127	-0.0005	
	<i>Coquillettidia</i>	<i>Culiseta</i>	-,018163350000000*	0.0032	0.012	-0.0313	-0.0050	
	<i>Culiseta</i>	<i>Anopheles</i>	,008792250000000*	0.0018	0.021	0.0016	0.0160	
	y4	<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	-,0065764052*	0.0010	<0.001	-0.0096	-0.0035

	<i>Culiseta</i>		-,0075055152*	0.0008	<0.001	-0.0102	-0.0048
	<i>Anopheles</i>		,0122593348*	0.0018	0.019	0.0032	0.0213
<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culex</i>		,0089884275*	0.0011	<0.001	0.0056	0.0123
	<i>Coquillettidia</i>		,0039766750*	0.0011	0.027	0.0004	0.0076
	<i>Anopheles</i>		,0188357400*	0.0019	0.002	0.0104	0.0272
<i>Culex</i>	<i>Coquillettidia</i>		-,0050117525*	0.0010	0.002	-0.0083	-0.0017
	<i>Culiseta</i>		-,0099175375*	0.0009	<0.001	-0.0128	-0.0070
	<i>Anopheles</i>		,0098473125*	0.0018	0.033	0.0012	0.0185
<i>Coquillettidia</i>	<i>Culiseta</i>		-,0049057850*	0.0009	0.009	-0.0084	-0.0014
	<i>Anopheles</i>		,0148590650*	0.0019	0.007	0.0061	0.0236
<i>Culiseta</i>	<i>Anopheles</i>		,0197648500*	0.0018	0.003	0.0108	0.0287
y5	<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	-,00423908707*	0.0012	0.009	-0.0077	-0.0008
	<i>Culex</i>		,00257636074*	0.0009	0.049	0.0000	0.0051
	<i>Culiseta</i>		-,00816904207*	0.0008	<0.001	-0.0107	-0.0056
<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culex</i>		,00681544781*	0.0011	<0.001	0.0035	0.0102
	<i>Culiseta</i>		-,00392995500*	0.0011	0.014	-0.0072	-0.0006
	<i>Anopheles</i>		,00865802000*	0.0014	0.001	0.0039	0.0134
<i>Culex</i>	<i>Coquillettidia</i>		-,00491753781*	0.0009	0.003	-0.0081	-0.0017
	<i>Culiseta</i>		-,01074540280*	0.0007	<0.001	-0.0132	-0.0083
<i>Coquillettidia</i>	<i>Culiseta</i>		-,00582786500*	0.0009	0.003	-0.0091	-0.0025
	<i>Anopheles</i>		,00676011000*	0.0012	0.012	0.0019	0.0116
<i>Culiseta</i>	<i>Anopheles</i>		,01258797500*	0.0011	0.001	0.0076	0.0175
<i>Anopheles</i>	<i>Aedes</i>		-0.00441893293	0.0012	0.061	-0.0091	0.0002
x6	<i>Aedes</i>	<i>Coquillettidia</i>	,008560014630000*	0.0015	0.008	0.0027	0.0144
	<i>Culiseta</i>		,008847414630000*	0.0012	0.002	0.0042	0.0134
<i>Ochlerotatus</i>	<i>Coquillettidia</i>		,007063750000000*	0.0016	0.019	0.0012	0.0129
	<i>Culiseta</i>		,007351150000000*	0.0013	0.003	0.0027	0.0120
<i>Culex</i>	<i>Coquillettidia</i>		,006698318750000*	0.0015	0.028	0.0008	0.0126
	<i>Culiseta</i>		,006985718750000*	0.0012	0.006	0.0024	0.0116
<i>Coquillettidia</i>	<i>Culiseta</i>		-,006272350000000*	0.0014	0.043	-0.0123	-0.0002
	<i>Culiseta</i>	<i>Culiseta</i>	-,006559750000000*	0.0011	0.017	-0.0115	-0.0017
y6	<i>Aedes</i>	<i>Culiseta</i>	-,006209413990000*	0.0011	0.024	-0.0113	-0.0011
	<i>Culex</i>	<i>Culiseta</i>	-0.004942381000000	0.0011	0.055	-0.0100	0.0001
x7	<i>Aedes</i>	<i>Culiseta</i>	,011826676800000*	0.0023	0.042	0.0006	0.0230
<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culiseta</i>		0.010630500000000	0.0023	0.057	-0.0004	0.0217
	<i>Culex</i>	<i>Culiseta</i>	,013681093800000*	0.0023	0.024	0.0026	0.0247
	<i>Culiseta</i>	<i>Anopheles</i>	-,014165500000000*	0.0029	0.021	-0.0259	-0.0025
y7	<i>Aedes</i>	<i>Culex</i>	-,0026578596*	0.0008	0.017	-0.0050	-0.0003
	<i>Anopheles</i>		-,0098127159*	0.0011	0.003	-0.0148	-0.0048
<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culex</i>		-,0044326388*	0.0010	0.001	-0.0074	-0.0015
	<i>Anopheles</i>		-,0115874950*	0.0013	<0.001	-0.0164	-0.0068
<i>Culex</i>	<i>Anopheles</i>		-,0071548563*	0.0012	0.009	-0.0120	-0.0023
<i>Coquillettidia</i>	<i>Anopheles</i>		-,0102553100*	0.0018	0.008	-0.0173	-0.0033
	<i>Culiseta</i>	<i>Anopheles</i>	-,0068992500*	0.0015	0.025	-0.0128	-0.0010
x8	<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	,006477175610000*	0.0017	0.005	0.0015	0.0115
	<i>Culiseta</i>		,018134975600000*	0.0023	0.008	0.0072	0.0291
<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culex</i>		-,008515325000000*	0.0018	<0.001	-0.0140	-0.0030
	<i>Culiseta</i>		,011657800000000*	0.0026	0.029	0.0014	0.0219
	<i>Anopheles</i>		-,011039200000000*	0.0027	0.046	-0.0219	-0.0002
<i>Culex</i>	<i>Culiseta</i>		,020173125000000*	0.0025	0.003	0.0097	0.0306
	<i>Culiseta</i>	<i>Anopheles</i>	-,022697000000000*	0.0031	0.003	-0.0351	-0.0103

y8	<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	,0075415751*	0.0009	<0.001	0.0049	0.0102
		<i>Anopheles</i>	-,0112842049*	0.0017	0.023	-0.0200	-0.0026
	<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culex</i>	-,0072584050*	0.0009	<0.001	-0.0100	-0.0045
		<i>Anopheles</i>	-,0188257800*	0.0018	0.002	-0.0269	-0.0107
	<i>Culex</i>	<i>Anopheles</i>	-,0115673750*	0.0017	0.020	-0.0202	-0.0029
	<i>Coquillettidia</i>	<i>Anopheles</i>	-,0126447800*	0.0025	0.012	-0.0221	-0.0032
x9	<i>Culiseta</i>	<i>Anopheles</i>	-,0151041500*	0.0021	0.003	-0.0235	-0.0067
	<i>Aedes</i>	<i>Culiseta</i>	,019084562200000*	0.0026	0.008	0.0073	0.0309
	<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culiseta</i>	,014599330000000*	0.0029	0.014	0.0033	0.0259
y9	<i>Culex</i>	<i>Culiseta</i>	,021025431300000*	0.0028	0.003	0.0096	0.0324
	<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	,0134004420*	0.0010	<0.001	0.0104	0.0164
		<i>Culex</i>	,0038352563*	0.0010	0.002	0.0010	0.0067
	<i>Coquillettidia</i>	<i>Culiseta</i>	,0042611420*	0.0010	0.014	0.0008	0.0077
		<i>Culiseta</i>	,0099937470*	0.0012	0.003	0.0048	0.0151
		<i>Anopheles</i>	-,0088285281*	0.0009	<0.001	-0.0119	-0.0058
	<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culex</i>	-,0095651856*	0.0011	<0.001	-0.0128	-0.0063
		<i>Coquillettidia</i>	-,0091393000*	0.0011	<0.001	-0.0128	-0.0055
		<i>Anopheles</i>	-,0222289700*	0.0010	<0.001	-0.0256	-0.0189
	<i>Culex</i>	<i>Culiseta</i>	,0061584906*	0.0013	0.020	0.0011	0.0112
		<i>Anopheles</i>	-,0126637844*	0.0010	<0.001	-0.0158	-0.0095
		<i>Coquillettidia</i>	<i>Culiseta</i>	,0057326050*	0.0013	0.037	0.0004
x10	<i>Coquillettidia</i>	<i>Anopheles</i>	-,0130896700*	0.0010	<0.001	-0.0169	-0.0093
		<i>Anopheles</i>	-,0188222750*	0.0012	<0.001	-0.0242	-0.0135
	<i>Aedes</i>	<i>Culex</i>	-,00871764771*	0.0017	<0.001	-0.0137	-0.0038
		<i>Culiseta</i>	,01594958820*	0.0024	0.002	0.0069	0.0250
	<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culiseta</i>	,01766363550*	0.0030	0.001	0.0078	0.0275
	<i>Culex</i>	<i>Coquillettidia</i>	,00930912144*	0.0017	0.007	0.0030	0.0157
<i>Culiseta</i>		,02466723590*	0.0021	0.001	0.0151	0.0343	
<i>Coquillettidia</i>	<i>Culiseta</i>	,01535811450*	0.0024	0.005	0.0058	0.0249	
y10	<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	,015742523300000*	0.0017	<0.001	0.0105	0.0210
		<i>Culex</i>	,005475162040000*	0.0015	0.009	0.0009	0.0100
	<i>Coquillettidia</i>	<i>Culiseta</i>	,007956448290000*	0.0017	0.011	0.0019	0.0140
		<i>Culiseta</i>	,015024168300000*	0.0028	0.032	0.0019	0.0282
		<i>Anopheles</i>	-,010598656700000*	0.0013	<0.001	-0.0146	-0.0066
	<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culex</i>	-,010267361300000*	0.0019	<0.001	-0.0158	-0.0047
		<i>Coquillettidia</i>	-,007786075000000*	0.0020	0.017	-0.0144	-0.0012
		<i>Anopheles</i>	-,026341180000000*	0.0016	<0.001	-0.0314	-0.0212
	<i>Culex</i>	<i>Anopheles</i>	-,016073818700000*	0.0014	<0.001	-0.0204	-0.0117
	<i>Coquillettidia</i>	<i>Anopheles</i>	-,018555105000000*	0.0016	<0.001	-0.0249	-0.0123
	<i>Culiseta</i>	<i>Anopheles</i>	-,025622825000000*	0.0027	0.007	-0.0393	-0.0119
	x11	<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	-,013077750400000*	0.0034	0.006	-0.0233
<i>Culex</i>			-,019004488500000*	0.0044	0.001	-0.0321	-0.0059
<i>Coquillettidia</i>		<i>Anopheles</i>	-,030752345400000*	0.0044	0.004	-0.0486	-0.0129
		<i>Anopheles</i>	-,027582260400000*	0.0036	0.004	-0.0431	-0.0121
		<i>Ochlerotatus</i>	<i>Coquillettidia</i>	-0.017674595000000	0.0050	0.051	-0.0354
<i>Culex</i>		<i>Culiseta</i>	,030169915000000*	0.0048	0.004	0.0118	0.0485
		<i>Culiseta</i>	,036096653100000*	0.0056	<0.001	0.0173	0.0549
		<i>Coquillettidia</i>	<i>Culiseta</i>	,047844510000000*	0.0056	0.001	0.0266
<i>Culiseta</i>	<i>Anopheles</i>	-,044674425000000*	0.0050	0.001	-0.0649	-0.0245	
y11	<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	,017616612700000*	0.0022	<0.001	0.0111	0.0241
		<i>Culex</i>	,007390020810000*	0.0020	0.004	0.0017	0.0131

		Coquillettidia	,011996592700000*	0.0021	0.002	0.0048	0.0192
		Culiseta	,020635542700000*	0.0020	<0.001	0.0132	0.0281
		Anopheles	-,010647432300000*	0.0016	<0.001	-0.0157	-0.0056
	Ochlerotatus	Culex	-,010226591900000*	0.0023	0.001	-0.0171	-0.0034
		Anopheles	-,028264045000000*	0.0020	<0.001	-0.0345	-0.0220
	Culex	Culiseta	,013245521900000*	0.0022	0.001	0.0057	0.0208
		Anopheles	-,018037453100000*	0.0018	<0.001	-0.0236	-0.0125
	Coquillettidia	Culiseta	0.008638950000000	0.0023	0.051	-0.0001	0.0173
		Anopheles	-,022644025000000*	0.0019	<0.001	-0.0301	-0.0152
	Culiseta	Anopheles	-,031282975000000*	0.0019	<0.001	-0.0392	-0.0233
x12	Aedes	Coquillettidia	,007977200000000*	0.0024	0.050	0.0000	0.0159
		Culiseta	,009165750000000*	0.0024	0.034	0.0006	0.0177
		Anopheles	,011669000000000*	0.0027	0.026	0.0015	0.0219
	Ochlerotatus	Anopheles	,010816400000000*	0.0028	0.040	0.0005	0.0211
x13	Aedes	Culiseta	-,018957591500000*	0.0046	0.002	-0.0328	-0.0052
		Anopheles	-,027914091500000*	0.0057	0.001	-0.0460	-0.0099
	Ochlerotatus	Culiseta	-,034857750000000*	0.0051	<0.001	-0.0509	-0.0188
		Anopheles	-,043814250000000*	0.0061	<0.001	-0.0633	-0.0243
	Culex	Culiseta	-,022301218800000*	0.0024	<0.001	-0.0295	-0.0151
		Anopheles	-,031257718800000*	0.0041	0.002	-0.0476	-0.0149
	Coquillettidia	Culiseta	-,036066250000000*	0.0069	0.034	-0.0684	-0.0038
		Anopheles	-,045022750000000*	0.0077	0.009	-0.0760	-0.0140
y13	Aedes	Ochlerotatus	-,0084779252*	0.0011	<0.001	-0.0118	-0.0052
		Culex	-,0046681559*	0.0008	<0.001	-0.0069	-0.0024
		Coquillettidia	-,0068307902*	0.0016	0.041	-0.0133	-0.0003
		Culiseta	-,0064942902*	0.0008	<0.001	-0.0093	-0.0037
	Ochlerotatus	Culex	,0038097694*	0.0011	0.015	0.0006	0.0071
		Anopheles	,0119993100*	0.0019	0.009	0.0039	0.0201
	Coquillettidia	Anopheles	,0103521750*	0.0022	0.021	0.0018	0.0189
	Culiseta	Anopheles	,0100156750*	0.0018	0.032	0.0013	0.0188
x14	Aedes	Culex	,03772111010*	0.0054	<0.001	0.0217	0.0537
	Ochlerotatus	Culex	,04282442830*	0.0055	<0.001	0.0266	0.0591
	Culex	Coquillettidia	-,04038718330*	0.0076	0.003	-0.0665	-0.0143
		Culiseta	-,04071285830*	0.0051	<0.001	-0.0562	-0.0252
		Anopheles	-,03134908330*	0.0063	0.002	-0.0516	-0.0111
y14	Aedes	Ochlerotatus	-,0062536635*	0.0009	<0.001	-0.0089	-0.0036
		Culex	-,0026722554*	0.0008	0.018	-0.0050	-0.0003
		Culiseta	-,0074054585*	0.0012	0.010	-0.0124	-0.0024
	Ochlerotatus	Culex	,0035814081*	0.0009	0.004	0.0008	0.0063
		Anopheles	,0098837050*	0.0011	<0.001	0.0060	0.0138
	Culex	Anopheles	,0063022969*	0.0010	0.004	0.0024	0.0102
	Coquillettidia	Culiseta	-0.0065017400	0.0017	0.054	-0.0131	0.0001
	Culiseta	Anopheles	,0110355000*	0.0013	0.002	0.0057	0.0164
x15	Aedes	Anopheles	,040923043900000*	0.0046	0.003	0.0204	0.0615
	Ochlerotatus	Anopheles	,034883880000000*	0.0044	0.009	0.0137	0.0561
	Culex	Anopheles	,033821625000000*	0.0045	0.008	0.0131	0.0546
	Culiseta	Anopheles	,038058850000000*	0.0043	0.008	0.0161	0.0600
y15	Aedes	Ochlerotatus	-,0058675413*	0.0008	<0.001	-0.0082	-0.0035
		Culiseta	-,0062934963*	0.0011	0.007	-0.0105	-0.0021
		Anopheles	,0025840787*	0.0007	0.013	0.0004	0.0048
	Ochlerotatus	Culex	,0035815263*	0.0008	0.001	0.0012	0.0060

		<i>Anopheles</i>	,0084516200*	0.0006	<0.001	0.0065	0.0104
	<i>Culex</i>	<i>Anopheles</i>	,0048700938*	0.0007	<0.001	0.0026	0.0071
	<i>Culiseta</i>	<i>Anopheles</i>	,0088775750*	0.0010	0.005	0.0043	0.0135
x16	<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	,01960388480*	0.0036	<0.001	0.0085	0.0307
		<i>Culex</i>	,01576060820*	0.0025	<0.001	0.0083	0.0232
	<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culiseta</i>	-,02049548600*	0.0053	0.041	-0.0401	-0.0009
		<i>Anopheles</i>	-,03694653600*	0.0081	0.050	-0.0738	-0.0001
y16	<i>Culex</i>	<i>Anopheles</i>	,003023121250000*	0.0008	0.039	0.0001	0.0059
x17	<i>Aedes</i>	<i>Culiseta</i>	-,022218146300000*	0.0033	0.000	-0.0335	-0.0110
		<i>Anopheles</i>	,016946103700000*	0.0039	0.028	0.0020	0.0319
	<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culiseta</i>	-,017002800000000*	0.0034	0.004	-0.0286	-0.0054
		<i>Anopheles</i>	,022161450000000*	0.0040	0.006	0.0071	0.0372
	<i>Culex</i>	<i>Culiseta</i>	-,020902750000000*	0.0028	0.002	-0.0320	-0.0098
		<i>Anopheles</i>	,018261500000000*	0.0036	0.027	0.0027	0.0338
	<i>Coquillettidia</i>	<i>Culiseta</i>	-,014725400000000*	0.0030	0.018	-0.0265	-0.0029
		<i>Anopheles</i>	,024438850000000*	0.0037	0.008	0.0087	0.0402
	<i>Culiseta</i>	<i>Anopheles</i>	,039164250000000*	0.0039	0.001	0.0230	0.0553
y17	<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	,00481658778*	0.0013	0.010	0.0009	0.0088
		<i>Culiseta</i>	,01990417380*	0.0022	0.008	0.0086	0.0312
	<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culiseta</i>	,01508758600*	0.0024	0.012	0.0046	0.0256
	<i>Culex</i>	<i>Culiseta</i>	,01832428090*	0.0023	0.009	0.0073	0.0294
	<i>Coquillettidia</i>	<i>Culiseta</i>	,01544242500*	0.0024	0.012	0.0047	0.0261
	<i>Culiseta</i>	<i>Anopheles</i>	-,02451846900*	0.0032	0.002	-0.0375	-0.0115
CS	<i>Aedes</i>	<i>Coquillettidia</i>	-	0.2180	0.001	-1.8597	-0.4540
		<i>Culiseta</i>	1,156843122000000*	-	0.1767	0.000	-2.7424
		<i>Culiseta</i>	2,209590122000000*	-	0.1767	0.000	-2.7424
	<i>Ochlerotatus</i>	<i>Culex</i>	-,805037625000000*	0.1529	0.000	-1.2652	-0.3448
		<i>Coquillettidia</i>	-	0.1964	<0.001	-2.3160	-0.9680
		<i>Culiseta</i>	1,641987500000000*	-	0.1492	<0.001	-3.1666
		<i>Culiseta</i>	2,694734500000000*	-	0.1492	<0.001	-3.1666
		<i>Anopheles</i>	-,900927000000000*	0.1287	<0.001	-1.3056	-0.4963
	<i>Culex</i>	<i>Coquillettidia</i>	-,836949875000000*	0.1724	0.015	-1.4928	-0.1811
		<i>Culiseta</i>	-	0.1157	<0.001	-2.2757	-1.5037
		<i>Culiseta</i>	1,889696875000000*	-	0.1157	<0.001	-2.2757
	<i>Coquillettidia</i>	<i>Culiseta</i>	-	0.1692	0.006	-1.7299	-0.3756
		<i>Culiseta</i>	1,052747000000000*	-	0.1692	0.006	-1.7299
		<i>Anopheles</i>	,741060500000000*	0.1514	0.042	0.0378	1.4444
	<i>Culiseta</i>	<i>Anopheles</i>	1,793807500000000*	0.0813	<0.001	1.3729	2.2147

*. Povprečna razlika je signifikantna pri 0.05.