

**PMF****By: Milica Jovanović**As of: Jun 28, 2022 9:59:35 AM  
47,377 words - 242 matches - 47 sources**Similarity Index****11%**

Mode: Similarity Report ▼

**paper text:**

UNIVERZITET CRNE GORE PRIRODNO - MATEMATIČKI FAKULTET STUDIJSKI PROGRAM ZA BIOLOGIJU Milica Jovanović  
 FILOGENIJA, FILOGEOGRAFIJA I DISTRIBUCIJA VRSTA GLOSSIPHONIIDAE (HIRUDINEA) I HYDRACHNIDIA (ACARI) NA  
 PODRUČJU SLIVA SKADARSKOG JEZERA DOKTORSKA DISERTACIJA PODGORICA, 2022. UNIVERZITET CRNE GORE  
 PRIRODNO – MATEMATIČKI FAKULTET STUDIJSKI PROGRAM ZA BIOLOGIJU Milica Jovanović FILOGENIJA,  
 FILOGEOGRAFIJA I DISTRIBUCIJA VRSTA GLOSSIPHONIIDAE (HIRUDINEA) I HYDRACHNIDIA (ACARI) NA PODRUČJU SLIVA  
 SKADARSKOG JEZERA

**DOKTORSKA DISERTACIJA PODGORICA** , 2022. **UNIVERSITY OF MONTENEGRO FACULTY OF**  
**NATURAL SCIENCES AND MATHEMATICS STUDY** PROGRAMME FOR **BIOLOGY**

21

Milica Jovanović PHYLOGENY, PHYLOGEOGRAPHY AND DISTRIBUTION OF GLOSSIPHONIIDAE (HIRUDINEA) AND  
 HYDRACHNIDIA (ACARI) IN THE SKADAR LAKE CATCHMENT AREA PHD THESIS PODGORICA, 2022 Jovanović M. Filogenija,  
 filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (...) i Hydrachnidia (...) na području sliva Skadarskog jezera. Doktorska  
 disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022. PODACI O DOKTORANDU

**Ime i prezime Datum i mjesto rođenja Naziv završenog studijskog programa i godina završetka**

34

Mentor Milica Jovanović 30.10.1993. Podgorica Dvogodišnji magistarski program „Zaštita prirode“ Univerzitet Primorska,  
 Slovenija 17.9.2018.

**Prof. dr Vladimir Pešić, redovni profesor** UCG, **Prirodno-matematički fakultet** , Studijski program  
**Biologija**

22

Komisija za ocjenu teme Predsjednik: prof. dr Drago Marić, redovni profesor UCG, Prirodno-matematičkog fakulteta, Studijski  
 program Biologija Član: prof. dr Danka Caković, vanredni profesor UCG, Prirodno-matematičkog fakulteta, Studijski program  
 Biologija Član: prof. dr Vladimir Pešić, redovni profesor UCG, Prirodno-matematičkog fakulteta, Studijski program Biologija

**Komisija za ocjenu i odbranu doktorske disertacije** Predsjednik: prof. **dr** Drago Marić, **redovni profesor** UCG, **Prirodno**

21

-matematičkog fakulteta, Studijski program Biologija Član: prof. dr Danka Caković, vanredni profesor UCG, Prirodno-matematičkog fakulteta, Studijski program Biologija Član: prof. dr Vladimir Pešić, redovni profesor UCG, Prirodno-matematičkog fakulteta, Studijski program Biologija Član: prof. dr Marko Miliša, vanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu, Prirodno- matematički fakultet, Biološki odsjek Član: doc. dr Dejan Dmitrović, docent Univerziteta u Banjoj Luci, Prirodno-matematički fakultet

**Datum odbrane: II PODACI O DOKTORSKOJ DISERTACIJI NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE**

20

: "FILOGENIJA, FILOGEOGRAFIJA I DISTRIBUCIJA VRSTA GLOSSIPHONIIDAE (HIRUDINEA) I HYDRACHNIDIA (ACARI) NA PODRUČJU SLIVA SKADARSKOG JEZERA" REZIME: Ovom doktorskom disertacijom testirana je efikasnost DNK barkodinga u filogenetičkim analizama i procesima identifikacije vrsta pijavica (Glossiphoniidae) i vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u slivu Skadarskog jezera i susjednim područjima. Pored toga, stvorena je referentna biblioteka DNK barkodova za ove dvije grupe beskičmenjaka. Kao rezultat našeg istraživanja, barkodirane su 33 jedinke pijavica porodice Glossiphoniidae i 232 jedinke vodenih grinja Hydrachnidia. Prvo su sve jedinke morfološki identifikovane, a zatim su sprovedene molekularno-genetičke analize. Ukupno je dobijeno 29 COI barkodova pijavica roda Glossiphonia i upoređeno sa dostupnim setom podataka iz baza GenBank / BOLD. Rezultati ovog istraživanja pokazali su, da se morfološki identifikovani taksoni *G. nebulosa* i *G. concolor*, sastoje od više od jedne jasno odvojene filogenetske klade. Rezultati morfološke analize i DNK barkod identifikacije vodenih grinja otkrili su 52 vrste u slivu Skadarskog jezera, sa 109 COI barkodova i 55 BIN-ova. Jedan broj analiziranih vrsta vodenih grinja ranije nije zabilježen u slivu Skadarskog jezera. Po prvi put potvrđeni su nalazi vrsta: *Lebertia reticulata*, *Atractides latipes*, *Parabanchypoda montii* i *Atractides inflatipalpis* u fauni vodenih grinja Crne Gore. Za faunu Hydrachnidia Balkanskog poluostrva otkrivene su tri, do sada nezabilježene vrste: *Piona laminata*, *Unionicola ypsilophora* i *Protzia octopora*. Konačno, pokazano je da stvorena biblioteka DNK barkodova ima visoku efikasnost u identifikaciji vrsta. Sa barkodiranih skoro 50 % poznatih vrsta pijavica porodice Glossiphoniidae i vodenih grinja sa teritorije Crne Gore, postavljena je dobra osnova za nastavak procesa barkodiranja faune Crne Gore. KLJUČNE RIJEČI: FILOGENIJA, FILOGEOGRAFIJA, DNK BARKODING, PIJAVICE, VODENE GRINJE, COI, RAZDVAJANJE VRSTA, SLIV SKADARSKOG JEZERA NAUČNA OBLAST: ZOOLOGIJA UŽA NAUČNA OBLAST: FILOGENIJA, EVOLUCIJA UDK BROJ: III KEW WORDS DOCUMENTATION PHD THESIS TOPIC: "PHYLOGENY, PHYLOGEOGRAPHY AND DISTRIBUTION OF GLOSSIPHONIIDAE (HIRUDINEA) AND HYDRACHNIDIA (ACARI) IN THE SKADAR LAKE CATCHMENT AREA" ABSTRACT: The main aim of this study was to to test the efficiency od DNA barcoding for the identification and phylogenetic analysis on leech family Glossiphoniidae and water mites (Acari, Hydrachnidia) from Skadar Lake basin and adjacent area. Another aim was to develop and test the efficiency of a reference DNA barcode library on these groups of invertebrates. Through this study, 33 individuals od Glossiphoniidae and 232 individuals of Hydrachnidia were barcoded. All individuals were morphologically identified and supported with molecular identification,

using different methods. In total, 29 new barcodes of leech genus *Glossiphonia* were sequenced and compared with the available molecular dataset from GenBank / BOLD databases. Our study revealed that morphologically identified taxa as *G. nebulosa* and *G. concolor* each consist of more than one clearly different phylogenetic clade. Morphological analysis and DNA barcoding identification of water mites revealed 52 species in the Skadar lake catchment area, with 109 COI barcodes and 55 BIN-s. Some of the species detected in this study had not been previously recorded in the Lake Skadar area. Four species were detected for the first time for the water mite fauna of Montenegro: *Lebertia reticulata*, *Atractides latipes*, *Parabanchypoda montii* and *Atractides inflatipalpis*) and three species for the Balkan fauna: *Piona laminata*, *Unionicola ypsilophora* i *Protzia octopora*. Our new DNA barcode library was shown to have a high identification efficiency. With barcodes of almost 50 % of known fauna of glossiphonid leeches and water mites of Montenegro, a good basis has been laid for the further studies on DNA barcoding in Montenegro. KEY WORDS: PHYLOGENY, PHYLOGEOGRAPHY, DNA BARCODING, LEECHES, WATER MITES, COI, SPECIES DELIMITATION, SKADAR LAKE CATCHMENT AREA WIDER SCIENTIFIC FIELD: ZOOLOGY SCIENTIFIC FIELD: PHYLOGENY, EVOLUTION UDK NUMBER: IV SADRŽAJ PODACI O DOKTORSKOJ DISERTACIJI III KEY WORDS DOCUMENTATION IV SADRŽAJ V TABELE VII SLIKE VIII PRILOZI VII SKRAĆENICE VIII 1. UVOD

..... 1.1.1 Opšte karakteristike pijavica (Hirudinea, Annelida)	
..... 3 1.1.2 Klasifikacija pijavica	..... 5 1.1.3 Opšte karakteristike porodice Glossiphoniidae Vaillant, 1890
..... 5 1.2 Pregled istraživanja faune pijavica u Crnoj Gori.....	8 1.3 Primjena molekularne filogenije u taksonomiji pijavica porodice Glossiphoniidae 18 1.4 Opšte karakteristike vodenih grinja Hydrachnidia (Acari, Trombidiformes) .....
19 1.4.1 Klasifikacija vodenih grinja.....	19

<b>1.4.2 Životni ciklus</b> .....	21	<b>1.4.3 Morfološke karakteristike</b> .....	22	<b>1.4.4 Anatomske karakteristike</b> .....	24	<b>1</b>
-----------------------------------	----	--	----	---	----	----------

27

.5 Pregled istraživanja faune vodenih grinja u Crnoj Gori .....	25 1.6 Primjena molekularnih metoda u taksonomiji vodenih grinja.....	26 1.7 Filogenija .....	27
1.8 Filogeografija .....	30 1.9 Ciljevi rada .....	31 2. MATERIJALI I METODE .....	31
..... 33 2.1.1 Područje istraživanja.....	34	2.1.2 Paleogeografska istraživanja .....	35 2.1.3 Limnološka istraživanja.....
36 2.1.4 Filogenetska istraživanja .....	37 2.2 Uzorkovanje i morfološke analize pijavica .....	38 2.3 Molekularno genetičke analize pijavica .....	41 2.4 Uzorkovanje i morfološke analize vodenih grinja.....
49 2.6 Bioinformatičke analize.....	52 2.6.1 Bioinformatičke analize pijavica .....	52 2.6.1.1 Uređivanje i poravnavanje nukleotidnih	

sekvenci .....	52	V 2.6.1.2 Filogenetičke i filogeografske analize .....	53
2.6.1.3 Razdvajanje vrsta.....	54	2.6.1.4 Analize pomoću BOLD platforme .....	55
.....	54	2.6.2 Bioinformatičke analize vodenih grinja .....	55
2.6.2.1 Uređivanje i poravnavanje nukleotidnih sekvenci .....	55	2.6.2.2 Filogenetičke i filogeografske analize .....	57
.....	55	2.6.2.3 Analize pomoću BOLD platforme .....	57
3. REZULTATI .....	59	3.1.1 Rezultati morfološke analize pijavica.....	60
.....	60	3.1.2 Rezultati molekularno-genetičkih analiza pijavica.....	62
.....	62	3.1.3 Genetičke distance i razdvajanje vrsta pijavica .....	69
Genetička varijabilnost sekvenci pijavica .....	71	3.2.1 Rezultati morfoloških analiza i DNK barkod identifikacije vodenih grinja.....	77
.....	77	3.2.2 Nove vrste vodenih grinja u fauni Crne Gore i Balkanskog poluostva.....	78
Distribucija vodenih grinja u slivu Skadarskog jezera .....	82	3.2.4 Filogenetski odnosi vodenih grinja u slivu Skadarskog jezera na osnovu DNK barkodinga .....	84
.....	84	3.2.5 Filogenetski odnosi vodenih grinja roda <i>Atractides</i> .....	103
.....	103	3.2.6 Genetička varijabilnost sekvenci vodenih grinja <i>Atractides</i> Koch, 1837.....	105
4. DISKUSIJA.....	109	4.1 Rezultati morfološke, filogenetičke i filogeografske analize pijavica porodice Glossiphoniidae .....	111
.....	111	4.2 Rezultati morfološke, filogenetičke i filogeografske analize vodenih grinja ( <i>Acari</i> , <i>Hydrachnidia</i> ) .....	114
.....	114	4.3 Otkrivanje kriptičnih i/ili pseudokriptičnih vrsta vodenih grinja .....	115
5. ZAKLJUČCI .....	120	6. LITERATURA .....	123
.....	123	7. PRILOZI.....	144
.....	144	VI Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (...) i Hydrachnidia (...) na području sliva Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022. POPIS TABELA Tabela 1: Podjela pijavica prema načinu ishrane Tabela 2: Klasifikacija pijavica Tabela 3: Lista svih pijavica koje su do sada zabilježene na teritoriji Crne Gore Tabela 4: Klasifikacija vodenih grinja na području Evrope Tabela 5: Nazivi lokaliteta, nadmorska visina i tip staništa na kojima su sakupljene pijavice Tabela 6: Uslovi PCR reakcije Tabela 7: Sastav PCR reakcijske smjese od 25 µl Tabela 8: Nazivi lokaliteta, nadmorska visina i tip staništa u slivu Skadarskog jezera na kojima su sakupljene vodene grinje Tabela 9: Nazivi taksona, informacije o lokalitetima i BOLD / GenBank brojevi za jedinke pijavica korištene u filogenetskoj analizi Tabela 10: Interspecifične srednje vrijednosti K2P distance analiziranih vrsta pijavica ( <i>Glossiphoniidae</i> ) (ispod dijagonale) i p-distance (iznad dijagonale) sa vrijednostima standardne devijacije Tabela 11: Osnovni parametri genetičkog diverziteta populacija pijavica <i>Glossiphonia</i> Tabela 12: Haplotipovi za COI sekvence analiziranih pijavica Tabela 13: Haplotipovi za COI sekvence analiziranih jedinki <i>G. complanata</i> Tabela 14. Vrijednosti K2P genetičke distance unutar različitih taksonomskih nivoa, procijenjene na osnovu analize 232 sekvence vodenih grinja sa područja Crne Gore. Lista svih vrsta data je u Prilogu 2. Tabela 15: Nazivi taksona, informacije o lokalitetima u slivu Skadarskog jezera i BOLD/ GenBank brojevi za jedinke vodenih grinja korištene u filogenetskoj analizi. Tabela 16: Osnovni parametri genetičkog diverziteta populacija vodenih grinja roda <i>Atractides</i> Tabela 17: Haplotipovi za COI sekvence analiziranih vodenih grinja <i>Atractides</i> Tabela 18: Vrste vodenih grinja sa maksimalnom intraspecifičnom distancom (ID) > 2.2%. VII sliva Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022. POPIS SLIKA Slika 1. <i>Glossiphonia complanata</i> subsp. <i>complanata</i> 1a – dorzalno (Njemačka), 1b – dorzalno, (Austrija), 1c – položaj očiju na glavi, 1d – ventralno,	

položaj usta i genitalnih pora. Slika 2. <i>Glossiphonia complanata</i> subsp. <i>maculosa</i> 2a, b – dorzalno, Makedonija, Ohridsko jezero	
.....14 Slika 3. <i>G. nebulosa</i> 3a – dorzalno. Slika 4. <i>G. paludosa</i> 4a – dorzalno Slika 5. <i>G. concolor</i> 5a – dorzalno (Dunav, Mađarska)	15
Slika 6. <i>G. balcanica</i> a – dorzalno, b – ventralno, c – prednja pijavka, d – raspored očiju (Dečani, Kosovo)	16
Slika 7. <i>G. pulchella</i> 3 – ventralno, 4 i 5 dorzo-marginalno, m – marginalne, p – paramedijalne bradavice (preuzeto i modificirano prema Sket (1968)). Slika 8. <i>Glossiphonia pulchella</i> (lijevo) i <i>Glossiphonia complanata</i> subsp. <i>complanata</i> (desno)	17
Slika 9. Životni ciklus vodenih grinja (preuzeto i modificirano iz Martin & Gerecke, 2009)	22
Slika 10. (lijevo) <i>Torrenticola barsica</i> - ventralno (1 - koksalne ploče, 2 - genitalno područje – 3 - noge). Slika 11. (desno) <i>Atractides inflatipalpis</i> - noga (1- peti segment (tibia), 2 - šesti segment (tarzus), 3 - sete).	23
Slika 12. Pogled sa Bobije na Skadarsko jezero	34
Slika 13. Mapa sliva Skadarskog jezera (preuzeto i modificirano prema Glöer-u u Pešić i ed. 2018)	35
Slika 14. Mapa Crne Gore sa označenim lokalitetima u slivu Skadarskog jezera na kojima su sakupljeni uzorci pijavica	38
Slika 15. (lijevo) Karuč, sublakustrični izvor Slika 16. (desno) Crno oko, limnokreni izvor	39
Slika 17. Sakupljanje pijavica (slika lijevo – ručno sakupljanje, slika desno i dolje – sakupljanje ručnom mrežicom)	39
Slika 18. Mapa šireg područja sa lokalitetima na kojima su sakupljene pijavice	40
Slika 19. Lijevo – pojedinačni vaučer. Slika desno – skladištenje vaučera koji čine zbirku vaučera NHM.	41
Slika 20. Provjera kvaliteta dobijenih PCR produkata pijavica nakon elektroforeze	45
VIII sliva Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022. Slika 21. Mapa Crne Gore sa lokalitetima u slivu Skadarskog jezera, na kojima su potvrđeni nalazi vodenih grinja	46
Slika 22. (lijevo gore) Moromiš, temporalna bara Slika 23. (lijevo dolje) Rijeka Crnojevića, donji tok rijeke Slika 24. (desno) Donja Plavnica (donji tok rijeke)	47
Slika 25. Šematski prikaz toka DNK barkodinga	49
Slika 26. Provjera kvaliteta dobijenih PCR produkata vodenih grinja nakon elektroforeze.	52
Slika 27. Prikaz seta podataka „DS – MNEHYD“ vodenih grinja u BOLD platformi.	58
Slika 28. Rezultat morfološke analize jedinki pijavica roda <i>Glossiphonia</i> .	60
Slika 29. Fotografije identifikovanih vrsta roda <i>Glossiphonia</i> sa Zapadnog Balkana.	61
Slika 30. Filogenetsko stablo “najveće vjerovatnoće” (maximum likelihood tree) porodice <i>Glossiphoniidae</i> .	64
Slika 31. Procentualna zastupljenost haplotipova koje su najfrekventniji među analiziranim jedinkama pijavica.	72
Slika 32. Mreža haplotipova (eng. median joining network) konstruisana sa 50 COI sekvenci pijavica porodice <i>Glossiphoniidae</i> .	73
Slika 33. Mreža haplotipova (eng. median joining network) četiri grupe subklada <i>G. complanata</i> na osnovu 28 analiziranih COI sekvenci.	75
Slika 34. (lijevo) Jedinka <i>Lebertia reticulata</i> sa lokaliteta izvor Vukovo vrelo, novi nalaz za Crnu Goru. Slika 35. (desno) Jedinka vrste <i>Unionicola ypsilophora</i> sa lokaliteta Rijeka Crnojevića, novi nalaz za Balkansko poluostrvo	79
Slika 36. Distribucija vodenih grinja u Crnoj Gori, dobijena na	

osnovu analize 232 jedinke.....83 Slika 37. Filogenetsko stablo vodenih grinja u slivu Skadarskog jezera, konstruisano metodom susjednog sparivanja na osnovu mitohondrijskog COI gena. ....87 Slika 38. Filogenija roda vodenih grinja *Atractides* .....104 Slika 39. Mreža haplotipova (eng. median joining network) vodenih grinja roda *Atractides*. ....108 IX sliva Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022. POPIS PRILOGA Prilog 1: Lista svih opisanih vrsta vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u fauni Crne Gore Prilog 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore Prilog 3: Pregled imena haplotipova i GenBank pristupnih brojeva za COI sekvence vodenih grinja roda *Atractides* koje su korištene za formiranje mreže haplotipova Prilog 4: Filogenetsko stablo vodenih grinja Crne Gore X SKRAĆENICE A, T, C, G adenin, timin, citozin, guanin; nuklotidi ASAP »Assemble Species by Automatic Partitioning« BIC »Bayesian Information Criterion« BIN »The

**Barcode Index Number« BOLD** »The **Barcode of Life Data Systems« bp**

45

bazni par CCDB Kanadski Centar za DNK Barkoding »Canadian Center for DNA Barcoding« COI podjedinica 1 citohrom c oksidaze DNK dezoksiribonukleinska kiselina ML »maximum likelihood« metoda rekonstrukcije stable NJ »neighbour joining« metoda rekonstrukcije stabla MOTU Molekularna Operativna Taksonomska Jedinica »Molecular Operational Taxonomic Unit« mtDNK mitohondrijska DNK NHM Prirodnjački muzej u Beču »Natural History Museum Vienna« OTU Operativna Taksonomska Jedinica »Operational Taxonomic Unit« PCR lančana reakcija polimeraze K2P korigovane genetičke distance »Kimura 2 Parameter« PD nekorigovane genetičke distance »pairwise distance«

**BLAST »Basic Local Alignment Search Tool« NCBI »National Center for Biotechnology Information**

4

« TBE tris-borat-EDTA XI|str. 1. UVOD Ovom doktorskom disertacijom obuhvaćene su dvije grupe beskičmenjaka: pijavice i vodene grinje. U carstvu životinja (lat. regnum Animalia), one pripadaju različitim razdjelima: člankovitim crvima (lat. phylum Annelida) i zglavkarima (lat. phylum Arthropoda). Njihova zajednička karakteristika je parazitski način života u određenim životnim stadijumima, usljed čega su razvile različite adaptacije kako bi preživjele na svojim domaćinima (Mehlhorn 2016). Predstavnici porodice Glossiphoniidae (Hirudinea, Annelida) hrane se krvlju vodenih gmizavaca, vodozemaca, kao i riba, vodenih ptica, ali ima i predstavnika koji parazitiraju na sisarima (uključujući i čovjeka) (

**Siddall & Bowerman 2006, Vamberger & Trontelj 2007, Moser et al. 2010, Oceguera-Figueroa et al**

24

2011, Cichocka **et al**

. 2021). Pored načina ishrane, na značajan uticaj pijavica u slatkovodnim ekosistemima ukazuje i karakteristika da su pojedine vrste (npr. *Placobdella costata*) vektori prenosa krvnih parazita, kao što su hemogregarine i tripanozome. Pijavice porodice Glossiphoniidae, značajni su dio slatkovodne bentoske faune svih kontinenata (izuzev Antarktika) (Kaygorodova et al. 2020).

Područje Crne Gore naseljava veći broj taksona, među kojima je široko rasprostranjena *Glossiphonia complanata* (Grosser et al. 2015a). Usljed opštih morfoloških karakteristika ove kosmopolitske vrste, vrlo često su i druge vrste roda *Glossiphonia*: *G. elegans*, *G. nebulosa*, *G. pulchella* i *G. verrucata* inicijalno prepoznate kao *G. complanata*. To je jedan od razloga zbog koga se razlikovanje taksona unutar porodice Glossiphoniidae, na osnovu malog broja morfoloških karakteristika koji su značajni za taksonomiju, pokazalo nedjelotvornim, a često dovodi i do pogrešnih taksonomskih zaključaka (Kaygorodova et al. 2020). Da bi se riješile nedoumice prilikom procjene vrsta, molekularno genetičke analize su integrisane sa klasičnom morfološkom analizom. Jedna od najčešćih molekularno- genetičkih metoda u brojnim istraživanjima, DNK barkoding, omogućila je uočavanje i otkrivanje kriptičnih vrsta unutar ove grupe pijavica (Pfeiffer et al. 2004, Siddall

et al. 2005, **Oceguera-Figueroa et al. 2011, Kaygorodova & Mandzyak, 2014, Kaygorodova 2020,** Darabi-Darestani et al

36

. 2021). U ovoj disertaciji, standardni filogenetski marker – fragment mitohondrijskog gena za podjedinicu 1 citohrom c oksidaze (COI), korišten je za razdvajanje vrsta pijavica unutar porodice Glossiphoniidae u slivu Skadarskog jezera, ali i na širem području zapadnog Balkana. Vodene grinje (Hydrachnidia, Acari, Arthropoda) kosmopolitska su grupa slatkovodnih paukolikih zglavkara, mada ima i vrsta koje su se prilagodile životu u moru, poput predstavnika porodice Pontarachnidae (Di Sabatino et al. 2008, 2010). Prisutne su na skoro svim kontinentima (izuzev Antarktiku). Naseljavaju različite tipove staništa: lentička, lotička, intersticijalna i temporalne vode. Hydrachnidia imaju složen životni ciklus, koji uključuje dva neaktivna stadijuma: protonimfu (između larve i deutonimfe) i tritonimfu (između deutonimfe i adulta); i tri aktivna stadijuma: larvu, deutonimfu i odrasle jedinke (adulte) (Davids et al. 2010). Larva skoro uvijek parazitira, dok su adulti predatori sitnih beskičmenjaka. S obzirom da su vodene grinje u larvenom stadijumu obligatni paraziti, njihovi domaćini imaju važnu ulogu u disperziji i dinamici populacija. Poznato je da veliki broj larvi, manje ili više selektivno, za domaćina bira predstavnike dvokrilaca (Chironomidae), ali parazitiraju i na drugim grupama insekata (Odonata, Trichoptera i sl.) (Bartsch et al. 2007). Novija istraživanja pokazala su da vodene grinje mogu biti dobri pokazatelji stanja ekosistema, posebno onih koji su zavisni od podzemnih voda (Pešić et al. 2019c). Međutim, dugotrajna taksonomska identifikacija predstavlja glavnu prepreku za njihovo značajnije učešće u programima brze procjene stanja ekosistema (Weigand et al. 2019). Tradicionalna morfološka analiza često potcjenjuje pravu raznolikost vodenih grinja. Posljednjih godina, istraživanja ove grupe beskičmenjaka unaprijeđena su korišćenjem molekularnih tehnika. Pokazalo se da je primjena integrativnog pristupa, koji uključuje morfološke karakteristike i molekularne podatke pogodna za: a) identifikaciju vrsta, posebno u slučaju kriptičnih vrsta; b) povezivanje neopisanih stadijuma sa opisanim stadijumima određene vrste i c) rekonstrukciju filogenetskih odnosa između i/ili unutar kompleksa vrsta (

**Martin et al. 2010, Fisher et al. 2017, Pešić et al. 2017, 2019a, 2020a**

35

, b, c, 2021a, b). U ovoj doktorskoj disertaciji, pomoću standardnog COI barkoding regiona analizirane su vodene grinje sakupljene na teritoriji Crne Gore, sa posebnim akcentom na područje sliva Skadarskog jezera. U Crnoj Gori, u poređenju sa drugim zemljama na Balkanu, ova grupa beskičmenjaka je među bolje istraženim. Sa druge strane, ovim radom vodene grinje analizirane su iz molekularne perspektive. Stvaranjem prve DNK barkod biblioteke vodenih grinja Crne Gore, postavljena je dobra osnova za buduća istraživanja ove grupe i poređenje sa drugim javno dostupnim bazama. 1.1 Opšte karakteristike pijavica (Hirudinea, Annelida) Pijavice su člankoviti crvi sa oko 680 opisanih vrsta (Sket & Trontelj 2008, Minelli et al. 2014). Najveći broj vrsta naseljava slatkovodna staništa, a oko 15% naseljava more (Sket & Trontelj 2008). Pored toga, poznat je jedan broj (~100) terestričnih vrsta. Zajedničke karakteristike svih pijavica su:

**prisustvo pijavki (jedna na zadnjem i jedna na prednjem kraju**

6

tijelu) i konstantan broj tjelesnih segmenata (33), koji su dodatno podijeljeni na obično tri do pet, a ponekad više od 10 prstenova (lat. anulus) (Sket & Trontelj 2008). Tijelo je podijeljeno na pet regiona: glaveni, prekliteralni, kliteralni, trupni i repni region (Sawyer, 1986, Nesseemann & Neubert 1999).

**Glava je građena od** protostomijuma ( lat . protostomium) **i pet segmenata koji su stopljeni**

6

sa glavom. Na glavi se nalaze oči, a njihov broj može biti različit, od 1 do 5 pari. Pored očiju, na protostomijumu su razvijena hemijska čula, koja omogućavaju pronalazak hrane (Sawyer, 1986). Kranijalna (prednja) pijavka smještena je na trbušnoj strani glavenog regiona. U prekliteralnom regionu nalaze se ždrijelo i prednji nefridijumi. Kliteralno područje sadrži jako razvijene bjelančevinaste žlijezde, a u sredini tog područja su jedan muški i jedan ženski polni otvor. Trupni region zauzima najveći dio tijela, a na njega se nastavlja region kaudalne (repne) pijavke. Tjelesni zid pijavica prekriven je kutikulom koju izlučuje epidermis. Ispod epidermisa su mišićni slojevi, koji su kod pijavica građeni na poseban način. Između slojeva uzdužnih i kružnih mišića nalaze se kosi mišići, koji pojačavaju rad ostalih mišića i omogućavaju kretanje pijavica (crvoliko puzanje, hodanje ili plivanje). U epidermisu su smještene brojne žlijezde, koje luče sluz ili stvaraju pigmente, i time uslovljavaju različitu obojenost pijavica (Mann 1962, Marinković 2020). Način ishrane uticao je na građu crijevnog sistema, ždrijela (lat. pharynx) i prisustvo rilice (lat. proboscis), pa se ove osobine smatraju najbitnijim taksonomskim karakterima pijavica (Tabela 1). Iako su hermafroditi, kod pijavica

**ne dolazi do procesa samooplodnje. Muški polni sistem** sačinjen **je od** 4 - 10 **serijalno raspoređenih** , okruglih **testisa. Od**

6

njih vode kratke cjevčice (lat. vas efferens), koja



**se spajaju u dva** sjemevoda (lat. **vassa deferentia**). **Otvor muškog polnog sistema nalazi se na 9. segmentu u** kliteralnom **regionu. Neke vrste** posjeduju kopulatorne organe, **dok druge pakuju spermatozoide u spermatofore, koje** lijepe na tijelo **druge jedinke** tokom **parenja** (Sawyer, 1986).

**Ženski polni sistem**

6

uvijek ima dva jajnika koji se nalaze ispred testisa. Iz jajnika izlaze dva

**jajovoda, spojeni u vaginu koja se otvara na 11. segmentu. Nakon kopulacije ili** razmjene **spermatofora,** **oplođene jajne ćelije se odlažu u kokone, koje**

6

luče jednoćelijske žlijezde kliteluma. Pijavice koje žive na kopnu, kokone polažu u vlažnu zemlju, a ostale vrste ih lijepe za vodene biljke ili neku drugu čvrstu podlogu (Marinković et al. 2020). Odstupanje od ovog pravila javlja se kod pojedinih predstavnika porodice Glossiphoniidae, koje čuvaju kokone na trbušnoj strani tijela do izlijeganja mladih. Razviće je direktno, bez larvenih stadijuma (Sket & Trontelj 2008). Tabela 1: Podjela pijavica prema načinu ishrane Predstavnicima Način ishrane Rhynchobdellida (najveći broj vrsta porodice Glossiphoniidae, Piscicolidae) Izbočeni proboscis (rilica) pomoću kojeg probijaju kožu svog plijena (hladnokrvnih i toplokrvnih kičmenjaka, mekušaca, larvi insekata itd.) i sisaju njihove tjelesne tečnosti ili tkiva. Arhynchobdellida (brojni predstavnici reda Hirudiniformes) Pomoću mišićave „mandibule“, koju koriste za stvaranje površinskih rana na koži kičmenjaka, čijom krvlju se hrane. U ždrijelu

**se nalaze pljuvačne** žlijezde **koje luče „hirudin“, enzim koji** sprječava **zgrušavanje krvi** . Crijevo **posjeduje brojne divertikulume za skladištenje hrane na duži vremenski period**

6

. Predstavnici porodica Haemopidae, Xerobdellidae Makrofagi, gutaju cio plijen npr. larve insekata, i reda Erpobdelliformes (u Evropi samo rakove, oligohete. Kod ovih pijavica, crijevo je u predstavnici porodice Erpobdellidae) obliku cijevi bez divertikuluma. Glavni faktori ugrožavanja pijavica su: uništavanje staništa, zagađenje i prekomjerno sakupljanje iz prirode u zdravstvene svrhe (npr. vrste iz roda Hirudo). Gajenje pijavica u različitim djelovima svijeta, obuhvata i više rodova sangvivornih pijavica (Kutschera, 2012). Zbog upotrebe u medicini, vrste iz ovih rodova bile su i predmet mnogih istraživanja, iako slobodnoživeće pijavice imaju značajno veći udio u cjelokupnoj fauni. 1.1.2 Klasifikacija pijavica

**Klasifikacija pijavica predstavljena je prema** Nesselmann & **Neubert (1999), koji su preuzeli** **klasifikaciju predloženu od** Sawyera ( **1986**) **uz određene modifikacije. Prema** njoj **Hirudinea imaju status klase i**

6

predstavljaju pijavice u užem smislu. Potom se one dijele na dva reda: Rhynchobdellida i Arhynchobdellida (Tabela 2). Red Rhynchobdellida obuhvata pijavice kod kojih se ždrijelo može ispružiti u proboscis (rilicu), koja služi za probijanje kože domaćina/plijena i usisavanje hrane. Ovaj red obuhvata tri porodice: Glossiphoniidae, Ozobanchidae i Piscicolidae (Tabela 2). Predstavnici reda Arhynchobdellida ne posjeduju proboscis, i podijeljeni su na dva podreda: Hirudiniformes i Erpobdelliformes (Tabela 2).

**Podred Hirudiniformes obuhvata hematofagne predstavnike koji su svrstani u porodice: Hemadipsidae i Hirudinidae** 6

. Podred Erpobdelliformes obuhvata makrofagne predatore, svrstane u dvije porodice: Erpobdellidae i Salifidae. Tabela 2: Klasifikacija pijavica (modifikovano prema Nesemann & Neubert, 1999) Klasa Hirudinea Lamarck, 1816 porodica Glossiphoniidae Vaillant, 1890 Red Rhynchobdellida R. Blanchard, 1894 porodica

**Ozobanchidae Pinto, 1921 porodica Piscicolidae Johnston, 1865 Red Arhynchobdellida R. Blanchard, 1894 podred Hirudiniformes Cabalero, 1952 podred Erpobdelliformes Sawyer 1986** 6

1.1.3 Opšte karakteristike porodice Glossiphoniidae Vaillant, 1890 Porodica Glossiphoniidae druga je najbrojnija porodica pijavica u Evropi (Sket & Trontelj 2008). Uključuje-208 vrsta iz 25 rodova koje naseljavaju skoro sva slatkovodna staništa na svim kontinentima (osim Antarktika) (Nesemann & Neubert 1999, Sket & Trontelj 2008, Kaygorodova et al. 2020). Taksonomija porodice Glossiphoniidae (prema Nesemann & Neubert, 1999) Phylum: ANNELIDA Classis: HIRUDINEA Ordo: RHYNCHOBDELLIDA Familia: Glossiphoniidae Genera: Alboglossiphonia<sup>1</sup> Batracobdella Batracobdelloides Glossiphonia Helobdella Hemiclepsis Placobdella Theromyzon Pijavice koje pripadaju ovoj porodici uglavnom su dorzoventralno spljoštene i dostižu manje dimenzije. Najveći broj predstavnika parazitira na kičmenjacima: vodozemcima, vodenim pticama, barskim kornjačama, sisarima i ribama, ali ima i predatora makroinvertebrata (Nesemann & Neubert 1999, Sidall et al. 2005, Chiangkul et al. 2021, Kwak et al. 2021). Najveća poznata pijavica, Haementeria ghilianii (južna Amerika), parazitira na sisarima. Sa druge strane, Helobdella stagnalis hrani se oligohetama, mekušcima, izopodama i hironomidama, dok je Glossiphonia complanata specijalista, koja se prvenstveno hrani mekušcima (Kwak et al. 2021). Pijavice porodice Glossiphoniidae sišu tjelesne tečnosti domaćina zahvaljujući proboscisu, muskularizovanom organu nalik cijevi koji prodire u tjelesni zid domaćina. Theromyzon tessulatum, pijavica koja parazitira u nazalnim kanalima vodenih ptica i Placobdella costata, ektoparazitska pijavica vodenih kornjača, imaju proboscice slične građe, izgrađene od uzdužnih, kružnih i radijalnih mišićnih vlakana. Zanimljivo je da porodica Glossiphoniidae sadrži i predatorske vrste, koje se hrane čitavim plijenom, ukoliko je on dovoljno mali (Sket & Trontelj 2008). Ovakav 1 evropski rodovi (izvor: Fauna Europea ; www.fauna-eu.org) makrofagni tip ishrane pokazuje Alboglossiphonia sp., tako što proboscisom obavija i guta cio plijen (Kwak et al. 2021). U okviru klase Hirudinea, jedino predstavnici porodice Glossiphoniidae pokazuju visok stepen brige o potomstvu. Prema Sawyeru (1971), postoje dva načina na koji štite svoje mlade: (A) kokone pričvršćuju na supstrat i pokrivaju ih svojim tijelom do izlijevanja mladih (Glossiphonia, Placobdella, Theromyzon i

Hemiclepsis) (B) kokone pričvršćuju direktno na trbušnu stranu tijela do izlivanja mladih (Helobdella i Batracobdella). 1.2 Pregled istraživanja faune pijavica u Crnoj Gori Istorija istraživanja pijavica u Crnoj Gori relativno je duga. Najranije publikacije objavili su Blanchard i Augener (prva polovina XX vijeka). Blanchard je objavio prvu listu sa 7 vrsta pijavica Crne Gore (1905), a Augener je pisao o pijavicama Balkanskog poluostrva (1925, 1936 i 1937). Prvu sveobuhvatnu publikaciju, koja se bavi pijavicama tadašnje Jugoslavije, objavio je Sket (1968), pod naslovom „K poznavanju favne pijavk (Hirudinea) Jugoslavije“. Prvi katalog pijavica Crne Gore napravio je Šapkarev (1984). Ova dva autora postavila su osnove za istraživanje faune pijavica na ovim prostorima. Početkom 2000-ih, povećava se broj istraživanja posvećen ovoj grupi beskičmenjaka. Zabilježene su nove vrste za Crnu Goru (Grosser &

**Pešić 2005, Grosser et al. 2007, Utevsky et al. 2013), a**

15

sačinjena je i lista pijavica Crne Gore (Grosser et al. 2015a). Od ukupno 29 vrsta pijavica u Crnoj Gori, na području Skadarskog jezera zabilježeno je 52 % od ukupnog broja (Pešić et al. 2018c). Iako je najviše nalaza pijavica potvrđeno na lokalitetima iz samog jezera, jedan broj vrsta nađen je u sublakustričnim izvorima (Glossiphonia paludosa, G. cf. pulchella). Posljednjih godina, značajan doprinos proučavanju podreda Erpobdelliformes u Crnoj Gori (i na cjelokupnom zapadnom Balkanu), dao je Marinković (2020). Porodici Glossiphoniidae pripada skoro 50 % faune pijavica Crne Gore, što je čini najbrojnijom porodicom na ovom području (Grosser et al. 2015a). Do sada je potvrđeno 14 vrsta iz sedam rodova: Alboglossiphonia, Glossiphonia, Helobdella, Hemiclepsis, Placobdella, Batracobdelloides i Theromyzon (Tabela 3). Najveći broj vrsta (šest) pripada rodu Glossiphonia, rod Alboglossiphonia sadrži tri vrste, a svi preostali rodovi prisutni su sa po jednom vrstom. Na području sliva Skadarskog jezera nema zabilježenih endemičnih vrsta pijavica. U ovom poglavlju, pored liste svih opisanih vrsta pijavica u Crnoj Gori, predstavljen je kratak pregled istraživanja i osnovne karakteristike rodova i vrsta koje pripadaju porodici Glossiphoniidae. Tabela 3: Lista svih pijavica koje su do sada zabilježene na području Crne Gore (prema Sket (1968), Grosser & Pešić (2015a), Marinković (2020)). Vrste zabilježene na području sliva Skadarskog jezera označene su zvjezdicom (\*). Broj vrsta Blanchard (1905) Augener (1936-1937) Sket (1968) Ostali autori porodica Glossiphoniidae Vaillant, 1890 1 Alboglossiphonia hyalina Lukin, 1976 \* + + Grosser et al. (2015a) 2 Alboglossiphonia striata (Apáthy, 1888) \* Grosser et al. (2015a) 3 Alboglossiphonia heteroclita (Linnaeus, 1761) \* Grosser et al. (2015a) 4 Glossiphonia complanata (Linnaeus, 1758) \* + + + 5 Glossiphonia balcanica (Grosser & Pešić 2016) Grosser et al. (2016) 6

**Glossiphonia concolor (Apáthy, 1888) \* + 7 Glossiphonia nebulosa Kalbe, 1964 \* + 8 Glossiphonia paludosa (Carena, 1824) 37**

) \* Grosser et al. (2015a) 9 Glossiphonia cf. pulchella Sket, 1968 \* + 10 Helobdella stagnalis (Linnaeus, 1758) \* + Grosser et al. (2015a) 11

**Hemiclepsis marginata (O. F. Müller, 1774 ) \* + 12 Placobdella costata (Fr. Müller, 1846 ) \* Šapkarev (1984) 13 Batracobdelloides moogi Nesemann & Csanyi, 1995** 26

\* Grosser & Pešić (2005) 14 Theromyzon tessulatum (Müller, 1774) + Broj Vrsta Blanchard (1905) Augener (1936-1937) Sket (1968) Ostali autori porodica Piscicolidae Johnston, 1865 15 Piscicola pawlowskii Grosser et (Sket, 1968) \* al. (2015a) 16 Piscicola respirans Grosser et Troschel, 1850 al. (2015a) porodica Haemopidae Richardson, 1969 17

**Haemopsis sanguisuga + (Linnaeus, 1758 ) \* + porodica Hirudinidae Whitman, 1886 18 Hirudo verbana Carena** 26

, Grosser et 1820 \* al. (2015a) 19 Hirudo medicinalis + (Linnaeus, 1758) + porodica Erpobdellidae R. Blanchard, 1894 20 Dina absoloni Johansson, 1913 \* + 21

**Dina lineata dinarica Sket, 1968 \* + 22 Dina cf. lineata montana Sket, 1968 ++ 23 Dina minuocolata Grosser, Moritz & Pešić, 2007** 6

\* Grosser et al. (2007) 24 Dina prokletijaca Grosser & Pešić, 2016 Grosser et al. (2016) 25 Erpobdella octocolata (Linnaeus, 1758) \* + + 26 Erpobdella nigricollis (Brandes, 1900) \* Grosser et al. (2015a) 27 Erpobdella testacea (Savigny, 1822) \* Utevsky et al. (2013) 28 Erpobdella vilnensis (Liskiewicz, 1925) \* Grosser et al. (2015a) Broj Vrsta Blanchard (1905) Augener (1936-1937) Sket (1968) Ostali autori 29 Trocheta dalmatina (Trocheta subviridis dalmatina) Sket, 1968 \* + Rod Alboglossiphonia Lukin, 1976 Vrste roda Alboglossiphonia, jedini su predstavnici porodice Glossiphoniidae koji posjeduju makrofagni način ishrane (Kwak et al. 2021). U Crnoj Gori, potvrđene su tri vrste iz ovog roda:

**Alboglossiphonia heteroclita (Linnaeus, 1758), Alboglossiphonia hyalina (O.F.Müller, 1774 ) i Alboglossiphonia striata (Apáthy, 1888** 16

). Vrsta A. heteroclita bila je u prošlosti podijeljena na tri varijeteta, koji se sada tumače kao tri različite vrste unutar ovog roda (

**A. heteroclita (Linnaeus, 1761) (syn. G. h. var. papillosa (Braun, 1805)), A. hyalina (O. F. Müller, 1774 ) i A. striata (Apáthy, 1888)). Alboglossiphonia heteroclita** 15

nađena je na području Skadarskog jezera (Blanchard, 1905) i u izvoru Mrzovići u Pljevljima (Sket, 1968), pod nazivom *Glossiphonia heteroclita*. Ova vrsta ima veoma širok areal rasprostranjenja, koji uključuje: Evropu, Sjevernu Ameriku, Indiju i Istočnu i Centralnu Afriku (Sket, 1968, Grosser et al. 2015a). Prvi nalaz vrste *Alboglossiphonia hyalina* za Crnu Goru potvrđen je na području sliva Skadarskog jezera (Virpazar, rijeka Orahovštica) tokom 2005. godine. Ova vrsta naseljava Centralnu i Istočnu Evropu (Grosser et al. 2015a). Dvije jedinke vrste *Alboglossiphonia striata* nađene su u sublakustričnom izvoru Karuč 2006. godine, što je bio prvi nalaz za Crnu Goru. Taksonomski status ove vrste nije u potpunosti jasan, jer se dugo smatrala varijetetom vrste *A. heteroclita*. Ova vrsta naseljava Centralnu i Istočnu Evropu (Grosser et al. 2015a). Rod *Helobdella* R. Blanchard, 1896 Rod *Helobdella* obuhvata uglavnom male, dorzoventralno spljoštene pijavice, čiji su preci odustali od parazitskog načina života u korist predatorstva na vodenim beskičmenjacima (Sidall & Borda, 2003). *Helobdella stagnalis* je jedina vrsta iz ovog roda, koja je nađena u Crnoj Gori. To je jedna od pijavica sa najširim arealom rasprostranjenja. Osim u Holartiku, nađena je u Južnoj Aziji, Etiopiji, Kongu i Južnoj Americi (Sket, 1968). Prvi nalaz za Crnu Goru objavio je Sket (1968) na Štavni (Komovi), a kasnije je njeno prisustvo potvrđeno i u slivu Skadarskog jezera (Rijeka Crnojevića), okolini Crnog jezera i Pošćenskim jezerima (Grosser et al. 2015a). Rod *Hemiclepsis* Vejdovsky, 1884 Rodu *Hemiclepsis* pripada 15 različitih vrsta ektoparazitskih pijavica (Bolotov et al. 2019). U Crnoj Gori nađena je *Hemiclepsis marginata* (Müller, 1774). Rasprostranjena je u cijeloj Evropi i većem dijelu Azije. Sket (1968) je potvrdio nalaz ove vrste u Plavskom jezeru. Nakon toga, Grosser et al. (2015a) objavili su novi nalaz *H. marginata* sa područja Podgorice (izvor Crno Oko). Rod *Placobdella* R. Blanchard, 1893 Predstavnici roda *Placobdella* rasprostranjeni su na teritoriji Sjeverne Amerike, sa izuzetkom dvije vrste: jedna je rasprostranjena u Evropi, a druga u Centralnoj Americi. Jedina vrsta iz roda *Placobdella*, koja je prisutna u Evropi je *Placobdella costata* (Müller, 1774). Ovu vrstu, prvi put na području Crne Gore (u okolini Virpazara), zabilježio je Šapkarev (1984). Nakon toga, *P. costata* zabilježena je na više lokaliteta u slivnom području Skadarskog jezera (Grosser et al. 2015a). Rod *Batracobdelloides* Oosthuizen in Sawyer Do nedavno je smatrano da rod *Batracobdelloides* sadrži tri vrste, međutim, Bolotov et al. (2019), potvrdili su da ovaj rod sadrži najmanje devet vrsta. Jedina evropska vrsta

***Batracobdelloides moogi* Nesemann & Csányi, 1995** nađena je u lokvi pored Danilovgrada , što je 31  
bio prvi nalaz ove rijetke pijavice u Crnoj Gori i na

Balkanskom poluostrvu (Grosser & Pešić, 2005). Rod *Theromyzon* Philippi, 1867 Rod *Theromyzon* obuhvata sangvivorne pijavice koje parazitiraju na vodenim pticama. Vrsta *Theromyzon tessulatum* (Müller, 1774) ima široko geografsko rasprostranjenje (Sket, 1968). Prisutna je i Evropi i Aziji, a našli su je i Africi i Sjevernoj i Južnoj Americi. U Crnoj Gori, njeno prisustvo zabilježio je Sket (1968), opisujući "veoma brojnom" populaciju ove vrste u Plavskom jezeru. Rod *Glossiphonia* Johnson, 1816 Nominalni rod ove porodice, *Glossiphonia*, u Crnoj Gori sadrži najveći broj vrsta pijavica. Ovom rodu pripada i nekoliko endemičnih taksona, poput podvrste *Glossiphonia complanata* subsp. *maculosa* i vrste *G. pulchella*, koje su nađene i opisane po prvi put u Ohridskom jezeru. Jedina vrsta iz ove porodice koja je endem Balkanskog poluostrva, *G. balcanica*, opisana je na tipskom lokalitetu na Kosovu (Grosser et al. 2016). Do sada je u Crnoj Gori registrovano šest vrsta pijavica koje pripadaju rodu *Glossiphonia*: 1. *G. complanata* 4. *G. concolor* 2. *G. nebulosa* 5. *G. balcanica* 3. *G. paludosa* 6. *G. pulchella* i) *Glossiphonia complanata* (Linnaeus, 1758)

**Glossiphonia complanata** subsp. **complanata Linnaeus 1758** i **Glossiphonia complanata** subsp. **maculosa Sket, 1968** 8

, dvije su opisane podvrste pijavica *G. complanata*. (Slike 1 i 2). *G. c. complanata* je široko rasprostranjena i može se naći u svim tipovima tekućih i stajaćih voda (Nesemann & Neubert 1999). Dostiže dimenzije oko 20 mm, a najviše 40 mm. Tijelo je ovalnog oblika i u glavenom regionu izdvajaju se tri para očiju, od kojih je prvi par manjih dimenzija (Slika 1). Puževi *Bithynia tentaculata* L., *Sphaerium* spp. i *Pisidium* spp. glavni su plijen ove predatorske pijavice. Od 1905. godine, *G. c. complanata* zabilježena je širom Crne Gore u više navrata (Blanchard 1905, Augener 1936-37, Sket 1968, Grosser et al. 2016). *Glossiphonia complanata* subsp. *maculosa* prvi put je opisana na lokalitetu izvori Sv. Nauma kod Ohridskog jezera (Sket, 1968). Dostiže dimenzije do 17 mm. Za razliku od nominalne podvrste, odlikuje je izostanak dorzalne papile i smeđe, asimetrične i mrežaste šare koje potpuno pokrivaju tijelo (Slika 2) (Sket 1968, Nesemann & Neubert 1999). Slika 1. *Glossiphonia complanata* subsp. *complanata* 1a – dorzalno (jedinka sakupljena u Njemačkoj), 1b – dorzalno (jedinka sakupljena u Austriji), 1c – položaj očiju na glavi, 1d – ventralno, položaj usta i genitalnih pora. Slika 2. *Glossiphonia complanata* subsp. *maculosa* 2a, b – dorzalno (jedinka sakupljena u Ohridskom jezeru, S. Makedonija) (preuzeto i modificirano iz Nesemann i Neubert (1999)). ii) *Glossiphonia nebulosa* Kalbe, 1964 Distribucija vrste *Glossiphonia nebulosa* nije najjasnija, jer se može lako zamijeniti sa *G. complanata*, *G. verrucata* i *G. concolor* (Nesemann & Neubert 1999). Prema istim autorima, rasprostranjenost ove vrste vezuje se za centralnu Evropu (cjelokupna dužina rijeke Dunav), a samo jedan nalaz je vezan za jugozapadnu Tursku. Na području Crne Gore, ova vrsta nađena je po prvi put u Plavskom jezeru (Sket, 1968). Nakon toga, prema Grosser et al. (2015a) zabilježena i u slivu Skadarskog jezera, ali i na drugim lokalitetima (izvor Prkos u Pljevljima, izvor u blizini Crnog jezera). Prisustvo u slivu Skadarskog jezera, predstavlja najjužniju tačku distribucije ove vrste u Evropi (Utevsky et al. 2013). Osnovne morfološke karakteristike *G. nebulosa* su: tijelo manjih dimenzija (do 25 mm), repna pijavka manjih dimenzija i gusto zbijena dva do tri para očiju (Slika 3). iii) *Glossiphonia paludosa* (Carena, 1824) Vrstu *Glossiphonia paludosa*, od ostalih vrsta roda *Glossiphonia*, odvaja broj divertikuluma na ždrijelu (kod njih je 7, a kod ostalih vrsta po 6 parova). *Glossiphonia paludosa* predator je brojnih puževa. Staništa ove vrste su sporo tekuće rijeke, nerijetko i preko 200 m n.v. (Nesemann & Neubert 1999). Na teritoriji Crne Gore, prema Grosser et al. (2016), prvi put je zabilježena u slivu Skadarskog jezera (Slika 4). iv) *Glossiphonia concolor* (Apathy, 1888) *Glossiphonia concolor* relativno je široko rasprostranjena vrsta i zabilježena je u sjevernoj, centralnoj i istočnoj Evropi (Grosser et al. 2015a). Srijeće se u jezerima, barama, rijekama i izorima na nižim nadmorskim visinama (Nesemann & Neubert 1999). Tijelo dostiže dimenzije do 35 mm. Površina tijela je glatka, pa je jedan od glavnih morfoloških karaktera izostanak dorzalnih papila (Slika 5). Sket (1968) je objavio prvi nalaz ove vrste za Crnu Goru (Plavsko jezero). Kasnije su jedinke ove vrste pronađene i u slivu Skadarskog jezera (Grosser et al. 2015a). Slika 3. *G. nebulosa* 3a – dorzalno (jedinka sakupljena u Mađarskoj). Slika 4. *G. paludosa* 4a – dorzalno (jedinka sakupljena u Mađarskoj) Slika 5. *G. concolor* 5a – dorzalno (jedinka sakupljena u Mađarskoj) (preuzeto i modificirano iz Nesemann (1990)). v) *Glossiphonia balcanica* Grosser & Pešić, 2016 *G. balcanica* prvi put je sakupljena na izvoru Toplla na Kosovu 2014. godine, a zatim su nalazi ove vrste potvrđeni na brojnim staništima u Crnoj Gori (Grosser et al. 2016). Osim toga, jedinka koja je opisana u litoralnoj zoni Skadarskog jezera kao *G. nebulosa* (Utevsky et al. 2013), naknadnim pregledom je preimenovana u novoopisanu vrstu *G. balcanica* (Grosser et al. 2016). Riječ je o vrsti varijabilnih dimenzija (5 - 10 mm), koja se od *G. nebulosa* razdvaja na osnovu boje (svijetlo braon u odnosu na

sivkasto obojene jedinke *G. nebulosa*) i odsustvu dorzalnih papila. Osim toga, isti autori navode razliku između ove dvije vrste, u srednjem naboru na prednjoj pijavki. Ovaj nabor je odlika populacije *G. nebulosa* sa Kosova, ali je slabo razvijena kod populacija ove vrste sa tipskog lokaliteta u Njemačkoj, dok kod predstavnika vrste *G. balcanica* uopšte nije razvijena (Slika 6) (Grosser et al. 2016). Slika 6. *G. balcanica* A – dorzalno, B – ventralno, C – prednja pijavka, D – raspored očiju (jedinka sakupljena u Dečanima, Kosovo) (preuzeto iz Grosser et al. 2016). vi) *Glossiphonia pulchella* Sket, 1968 Vrsta *G. pulchella* nađena je i po prvi put opisana za nauku, u litoralnoj zoni Ohridskog jezera (Sket 1968). Tijelo dostiže dimenzije do 6 mm, a boja tijela varira od bijele do rozo-sive (Slika 7 i 8) (Nesemann & Neubert 1999). Jedinke ove vrste zabilježene su i u slivu Skadarskog jezera (Grosser et al. 2016). Slika 7. *G. pulchella* 3 – ventralno, 4 i 5 dorzo-marginalno, m – marginalne, p – paramedijalne bradavice (preuzeto i modificirano prema Sket (1968)). Slika 8. *Glossiphonia pulchella* (lijevo) i *Glossiphonia complanata* subsp. *complanata* (desno) (preuzeto iz Minelli et al. (2014)). Osim pomenutih vrsta, ovdje navodimo i vrste koje nijesu nađene u Crnoj Gori, a čije su sekvence uključene u filogenetsku analizu u ovoj doktorskoj disertaciji: *G. verrucata* Müller, 1844 i *G. elegans* (Verrill, 1872). *G. verrucata* prvi put je opisana 1884. u disertaciji njemačkog biologa Frica Milera (Fritz Müller). Predstavlja rijetku vrstu sa ograničenom distribucijom na sjeverni Paleartik (Jueg 2013). U Centralnoj Evropi, nekoliko populacija ove vrste zabilježeno je na Dunavu, od Bavarske do Mađarske (Nesemann 1997, Nesemann & Neubert 1999, Jueg & Michalik 2018). Na osnovu zelenkaste boje tijela sa tamnim mrljama i grubim ivicama tijela, ova vrsta se odvaja od drugih vrsta ovog roda. *G. elegans* naseljava isključivo Sjevernu Ameriku (Mack & Kvist, 2019). 1.3 Primjena molekularne filogenije u taksonomiji pijavica Glossiphoniidae Sistematika pijavica zasniva se na morfološkim osobinama (građa ždrijela, prisustvo ili odsustvo proboscisa i segmentaciji), vrsti ishrane i geografskoj rasprostranjenosti (Nesemann & Neubert 1999, Saglam 2018). Nedostatak taksonoma specijalizovanih za determinaciju ove grupe beskičmenjaka, značajno usporava proces morfološke identifikacije. Osim toga, ponekad je teško isključivo na osnovu morfoloških karaktera prepoznati određenu vrstu. Zbog toga se posljednjih decenija bilježi porast studija koje koriste integrativni pristup, koji kombinuje morfološku analizu i molekularno genetičke podatke. Integrativnom metodom, rasprostranjenost i granice vrsta roda *Glossiphonia* ispitivalo je više autora (

**Siddall et al. 2005, Ocegüera-Figueroa & León-Règagnon 2014, Pérez-Flores et al. 2016, Mack & Kvist 2019,** 2  
**Kaygorodova et al. 2020**

, Darabi-Darestani et al. 2021). Na taj način riješen je taksonomski status i distribucija jednog broja vrsta. Sveobuhvatnom filogenetskom analizom unutar roda *Placobdella* (de Carle et al. 2017), na osnovu više molekularnih markera (COI, ND1, 12S RNK i ITS), utvrđeno je da je riječ o monofiletskoj grupi koja se pokazala kao sestrinska kladi rodova *Haementeria* i *Helobdella*. Mack & Kvist (2019), utvrdili su da je distribucija vrste *G. complanata* ograničena na evropski kontinent, dok *G. elegans* (Verrill, 1872) naseljava Sjevernu Ameriku. Nedavnom studijom Kvista et al. (2022), utvrđeno je postojanje sedam nezavisnih filogenetskih linija unutar dosadašnje poznate vrste *Placobdella costata*. Međutim, raznolikost i razgraničenje vrsta unutar ove grupe beskičmenjaka, još uvijek je slabo izučavana u mnogim djelovima njihovog areala, naročito na području Balkanskog poluostrva. 1.4 Opšte karakteristike vodenih grinja Hydrachnidia (Acari, Trombidiformes) Hydrachnidia, poznate kao vodene grinje, predstavljaju najraznovrsniju i najzastupljeniju grupu paukova (Arachnida) u slatkovodnim staništima (Davids et al. 2007). Do sada je opisano oko 7 500 vrsta širom svijeta, koje su grupisane u 550 rodova (Smit, 2020). Naseljavaju širok spektar

staništa: lotička, lentička, intersticijalne i temporalne vode. Jedna od karakteristika ove grupe je veliko bogatstvo zajednica, koje je najčešće praćeno izrazito malom gustinom populacija i uskim arealom rasprostranjenja. Naime, od 970 vrsta zabilježenih na području cijele Evrope, 25% (245 vrsta) zabilježeno

**je samo sa jednog lokaliteta i/ili samo sa jednom jedinkom (Gerecke et al. 2018**

14

). 1.4.1 Klasifikacija vodenih grinja U Tabeli 4. prikazana je podjela vodenih grinja na porodice i podporodice ("subfamilia"). Podjela na više taksonomske kategorije - nadporodice ("superfamilia") data je na osnovu filogenetskih analiza, a porodice su poređane prema alfabetskom redu. Izostavljene su one porodice koje se ne srijeću na području Evrope. Navedena je podjela vodenih grinja prema Bartsch et al. (2007). Tabela 4: Klasifikacija vodenih grinja na području Evrope (modifikovano prema Bartsch et al. (2007)). Nadporodica Porodica Podporodica Stygothrombioidea Stygothrombiidae Acherontacaridae Hydrovolziidae Eylaoidea Limnocharidae Eylaidae Piersigiidae Limnocharinae Piersigiinae Hydrachnoidea Hydrachnidae Hydrophantoidea Hydrodromidae Hydryphantidae Diplodontinae Hydryphantinae Protziinae Pseudohydryphantinae Tartarothyadinae Nadporodica Porodica Podporodica Euthyadinae Wandesiinae Lebertioidea Anisitsiellidae Bandakiopsidae Lebertiidae Oxidae Rutripalpidae Sperchontidae Teutoniidae Torrenenticolidae Anisistsiellinae Nilotoniinae Sperchontinae Torrenenticolinae Hygrobatoidae Aturidae Feltriidae Frontipodopsidae Hygrobatidae Lethaxonidae Limnesiidae Pionidae Pontarachnidae Unionicolidae Wettinidae Albiinae Aturinae Axonopsinae Hygrobatinae Kawamuracarinae Limnesiinae Foreliinae Huitfeldtiinae Tiphyinae Pionatacinae Unionicolinae Arrenuroidea Acalyptonotidae Arrenuridae Athienemanniidae Bogatiidae Chappuisididae Hungarohydracaridae Athiennemanniidae Bogatininae Chappuisidinae Hungarohydracarinae Nadporodica Porodica Podporodica Krendrowskiidae Mideidae Momoniidae Mideopsidae Neoacaridae Nudomideopsidae Balcanohydracarinae Momonidinae Momoniinae Stygomomoniinae Mideopsinae 1.4.2 Životni ciklus Vodene grinje imaju složene životne cikluse, koji ih povezuju sa nizom vodenih beskičmenjaka (Slika 9). Nakon embrionalnog razvića oplođenih jaja i izlijeganja, ulaze u larvenu fazu. U ovoj fazi,

**kreću se plivajući u vodi ili puzeći po sedimentu, u aktivnoj potrazi za domaćinom ( Martin, 2000**

14

). Samim tim, vodene grinje su obligatni paraziti u larvenoj fazi,

**koji parazitiraju uglavnom na vodenim insektima. Uloga larve je pronalazak insekta, koji je u procesu emergencije , odnosno, prelaska iz larvenog stadijuma u odraslu jedinku (Martin, 2003**

14

). Zahvaljujući ovom stadijumu, vodene grinje su danas rasprostranjene u svim slatkovodnim ekosistemima umjerenog i tropskog pojasa (Dabert et al. 2016). Nakon larvene faze, počinje faza protonimfe, koja predstavlja prvu latentnu fazu vodenih



grinja. U ovoj

**fazi, protonimfa se zakopava u sediment i razvija u deutonimfu. Ova faza može trajati i do 14 nekoliko mjeseci , ako su uslovi nepovoljni**

(

**Belozarov, 2009). U fazi deutonimfe , vodene grinje izlaze iz sedimenta i žive kao aktivni predatori**

(Smith et al. 2001).

**Tritonimfe su druga latentna faza vodenih grinja, u kojoj prelaze iz deutonimfe u odrasle (adultne) jedinke. U adultnom stadijumu, aktivni su**

predatori, koji se hrane oportunistički, tj. konzumiraju raznovrsnu hranu životinjskog porijekla. Najčešći plijen su larve dvokrilaca (Chironomidae) ili oligoheta, a često i ostrakode (Ostracoda), račići (Copepoda i Cladocera), kao i jaja raznih makroskopskih beskičmenjaka (Martin, 2005). Slika 9. Životni ciklus vodenih grinja (preuzeto i modificirano iz Martin & Gerecke, 2009) 1.4.3 Morfološke karakteristike Dimenzije adultnih jedinki Hydrachnidia kreću se u rasponu od 0.2 do 10 mm (Davids et al. 2007), mada najveći broj vodenih grinja dostiže dimenzije od 0.5 do 2 mm. Tijelo je podijeljeno na dva regiona: gnatozomu (prednji dio) i idiozomu (zadnji dio). Tijelo prekriva integument, koji se sastoji iz egzo-, endo- i epikutikule (Davids et al. 2007). Sete i bodlje su strukturni dijelovi integumenta. Sete su glavni taktilni receptori, a dobili su sekundarnu funkciju u kretanju, ishrani i parenju. Gnatozoma se sastoji od kapituluma (gnatozomalne baze) i dodataka, odnosno helicera i pedipalpi (Mitchell 1962, Davids et al. 2007). Helicere služe za probijanje integumenta plijena i završavaju se kliještima (Davids et al. 2007). Pedipalpi imaju taktilnu i raptorijalnu ulogu (prilikom hvatanja plijena). Sastoje se od pet pokretnih segmenata (redom od prvog do petog): trohanter, femur, genu, tibia i tarsus (Davids et al. 2007, Di Sabatino et al. 2010). Idiozoma je okruglog ili ovalnog oblika, blago dorzoventralno spljoštena i većinom nesklerotizovana (Smith et al. 2001). Dorzalni integument sadrži neparno srednje oko, parne lateralne oči, parne preokularne i okularne sete, uzdužno raspoređene parne glandularne (odbrambene) žlijezde (šest dorzalnih i pet lateralnih) (Smith et al. 2001). Ventralni integument sadrži parne koksalne ploče, genitalno područje, pet pari ventralnih glandularnih žlijezda i ekskretornu poru (Slika 10). Slika 10. (lijevo) *Torrenticola barsica* - ventralno (1 - koksalne ploče, 2 - genitalno područje – 3 - noge). Slika 11. (desno) *Atractides inflatipalpis* - noga (1- peti segment (tibia), 2 - šesti segment (tarsus), 3 - sete) (fotografija: V. Pešić) Noge vodenih grinja su različite, što zavisi od njihove namjene. One služe za hodanje, plivanje ili za prihvatanje. Sastoje se od šest pokretnih segmenata, redom od prvog do šestog: trochanter, basifemur, telofemur, genu, tibia i tarsus. Prvi bazalni segmenti (kokse), inkorporisani su na ventralnoj strani tijela. Kod onih vrsta vodenih grinja, koji su bolji plivači, noge imaju duže segmente prekrivene nizovima tankih seta (Slika 11) (Smith et al. 2001). 1.4.4

Anatomske karakteristike Sistem organa smješten je u hemocelu, okupanim hemolimfom, koja cirkuliše pokretima tjelesne muskulature (Schmidt 1935, Mitchell 1962, Smith et al. 2001). Digestija započinje već unutar plijena. Vodene grinje helicerama hvataju žrtvu i u nju izlučuju produkte pljuvačnih žlijezda, a zatim pomoću ždrijelne pumpe uvlače tečnu hranu. Zatim se ona transportuje kroz usta, muskulozno ždrijelo i jednjak, do srednjeg crijeva, gdje se odvijaju procesi digestije i apsorpcije (Bader 1938, Smith et al. 2001). Svi divertikulumi srednjeg crijeva završavaju se slijepo; nema povezanosti između crijeva i ekskretorne pore (Smith et al. 2001). Ekskretorni sistem predstavljen je sistemom cjevčica, koje su smještene u neposrednoj blizini srednjeg crijeva. Konačne ekskretorne produkte apsorbuje hemolimfa, i skladišti u ekskretornim cjevčicama u vidu bijelih ili žutih, nerastvorljivih kristala nepoznatog hemijskog sastava (Smith et al. 2001). Mnoge grupe vodenih grinja zadržale su parne stigme (smještene između bazalnih osnova helicera), koje vode u traheje, a one se mrežom cjevčica granaju po cijelom tijelu (Smith et al. 2001). Međutim, one su nefunkcionalne kod deutonimfi i adutnih jedinki, pa se respiracija odvija difuzijom kroz integument. Kod adultnih jedinki, mnogih vrsta vodenih grinja koje naseljavaju stajaće vode, razvijen je zatvoreni sistem cjevčica. On je smješten neposredno ispod integumenta i ima ulogu transporta gasova do unutrašnjih organa (Mitchell 1970, Smith et al. 2001). Nervni sistem je predstavljen nediferenciranom ganglijskom masom, koja okružuje jednjak. Od nje polaze dorzalni nervi ka čulnim organima i usnim djelovima, a ventralni nervi inervišu noge i genitalne regione (Smith et al. 2001). Muški polni sistem čine parni testisi i sjemevodi, koji vode u ejakulatorni kompleks (Barr 1972, Smith et al. 2001), odnosno sistem membranoznih komora, koji služi za skladištenje spermatozoida. Ovaj kompleks podsjeća na špric, pomoću koga se spermatozoidi izbacuju iz genitalnog trakta kroz gonoporu (Davids et al. 2007). Ženski polni sistem čine parni jajnici, koji su djelimično povezani, i parni jajovodi, koji se spajaju u jedinstven kanal koji vodi do gonopore (Smith et al. 2001, Davids et al. 2007).

### 1.5 Pregled istraživanja faune vodenih grinja u Crnoj Gori Istorija istraživanja faune vodenih grinja u Crnoj Gori počela je prije više od jednog vijeka, tačnije 1903. godine. Veliki broj studija doprinio je opisivanju 201 vrste vodenih grinja, koje su do sada poznate u Crnoj Gori (Prilog 1). To čini 50 % vrsta opisanih na Balkanu, koji je procijenjen na 400 vrsta (Pešić et al. 2018a). Najraniju publikaciju o vodenim grinjama sa područja bazena Skadarskog jezera objavio je češki zoolog Thon (1903). Sadržala je listu od trinaest vrsta vodenih grinja. One su bile dio materijala, koji je sakupio češki profesor Mrazek (1903). Nakon toga, Muzelijus je sačinio listu od sedam vrsta iz bazena Skadarskog jezera (Musselius 1912). Tokom istraživanja vodenih grinja Jugoslavije, Viets (1936) je zabilježio devet vrsta sa ovog područja. Nakon duže pauze, početkom 2000-ih, istraživanje vodenih grinja nastavio je Pešić. Objavio je listu od 49 vrsta vodenih grinja iz stajaćih voda Skadarskog jezera (2002c). U posljednje dvije decenije, samostalno ili u koautorstvu, publikovao je više od 20 radova sa podacima o vodenim grinjama iz sliva Skadarskog jezera (Pešić et al. 1999-2022).

### 1.6 Primjena molekularnih metoda u taksonomiji vodenih grinja Najveći broj poznatih vrsta vodenih grinja opisan je na osnovu morfoloških karaktera, a broj radova koji uključuju molekularno genetičke metode, u cilju provjere i dopune ovih opisa, i dalje je relativno oskudan (Blattner et al. 2019). Bez obzira na to, brojne studije pokazale su, da genetičko razdvajanje vrsta koje se temelji na upotrebi mitohondrijskog COI gena, ima veliki potencijal u otkrivanju novih vrsta, rješavanju taksonomskih pitanja i daje značajan doprinos procjenama biodiverziteta (Mächler

et al. 2014 , Montagna et al. 2016 , Elbrecht et al. 2017 , Blattner et al

41

. 2019). Metode koje su nedavno razvijene, poput metabarkodiranja (eng. metabarcoding; istovremena identifikacija većeg broja jedinki) i metode eDNK (eng. environmental DNA; DNK prikupljena u životnoj sredini), zasnivaju se na prethodno uspostavljenim i pouzdanim referentnim bazama podataka. Treba istaći da je, u cilju postizanja najboljih rezultata, neophodno ispravno taksonomsko znanje i postojanje preciznih opisa vrsta. Molekularno genetičke analize vodenih grinja baziraju se na analizi mitohondrijskog plazmida (mtDNK), koje uključuje uniparentalno nasljeđivanje, ili jedarnom genomu (nDNK) kada ispituje biparentalno nasljeđivanje (Stryjecki et al. 2016). Studija Blattnera et al. (2019), pokazala je da pri odabiru molekularnih markera, treba biti obazriv, u skladu sa ciljevima istraživanja. Analiza fragmenta COI gena mtDNK, kao standardnog barkodiranja markera, pokazala se uspješnom kod određivanja vrsta vodenih grinja, ali nije pogodna za njihovo svrstavanje u više taksonomske kategorije (npr. rodove, porodice ili nadporodice). Istraživanja u kojima je morfologija zamijenjena integrativnom metodom, koji kombinuje morfološke karakteristike i molekularne podatke (

**Martin et al. 2010** , Dabert **et al** . 2016, **Fisher et al. 2017, Pešić et al** . 2017, **Pešić et al** . 2019a, b, **Pešić** 3

et al. 2020b, c, d), omogućila je otkrivanje prethodno zanemarenih ili pogrešno identifikovanih vrsta vodenih grinja. Na osnovu molekularnih analiza, Martin et al. (2010) utvrdili su da se kompleks vrsta označen kao *Hygrobatas nigromaculatus* sastoji od dvije odvojene vrste. Oni su predložili da se populacije koje naseljavaju jezera i rijeke rangiraju na nivou vrsta: *H. nigromaculatus* u jezerima i *H. setosus* u potocima. Dabert et al. (2016) koristili su više molekularnih markera na osnovu kojih su izveli zaključke o filogenetskim odnosima unutar viših taksonomskih kategorija (nadporodica) vodenih grinja. Pešić et al. (2017) istraživali su kompleks *Hygrobatas fluviatilis* i došli do zaključaka da je u pitanju kompleks od šest vrsta, a naknadno su u ovom kompleksu opisane dvije nove vrste sa područja Balkanskog poluostrva (Pešić et al. 2020a). Osim toga, unutar kompleksa vrsta *H. nigromaculatus* opisane su dvije nove vrste *H. lacrima* i *H. limnocrenicus* (Pešić et al. 2020c). 1.7

**Filogenija** **Filogenija je** naučna **disciplina koja se bavi** izučavanjem evolutivne **prošlosti različitih** 4  
**taksonomskih kategorija** (Whiley & Lieberman, 2011). **Proučava odnose između i unutar pojedinih taksona**  
**na osnovu morfoloških, anatomskih, fizioloških, etoloških, ekoloških, biogeografskih i paleontoloških**  
**karakteristika** . Osnove **za proučavanje filogenije su homologije, odnosno sličnosti između organizama koje su**  
**posljedica nasljeđivanja od zajedničkog pretka. Prilikom**

rekonstrukcije filogenetskih odnosa bitno je razlikovati homologije od homoplazija.

**Homoplazija predstavlja sličnosti između pojedinih taksona** koji nijesu **rezultat nasljeđivanja od** 4  
**zajedničkog pretka, već su posljedica** paralelne, **reverzne ili konvergentne evolucije (Kalafatić, 1998**

).

**Molekularna filogenija proučava** srodničke **odnose između i unutar pojedinih taksona na** nivou **makromolekula**

4

, odnosno, na nivou DNK, RNK i

**proteina. Molekularno- filogenetička analiza** spoj **je molekularno-bioloških i bioinformatičkih tehnika**. Obuhvata **izolaciju i** umnožavanje DNK **iz odabranog organizma**, sekvencioniranje, poravnavanje **sekvenci proučavanih** grupa, **određivanje** supstitucionog **modela za** konstruisanje **filogenetskog stabla, rekonstrukciju filogenetskog stabla i njegovu analizu**. Najbitniji **element u proučavanju** srodničkih intra- **i interspecifičnih odnosa** je **odabir**

4

adekvatnog molekularno-genetičkog markera. U filogenetskim rekonstrukcijama preporučuje se korišćenje više markera, koji imaju varijabilnu brzinu mutacija i različitog su porijekla (nuklearni, citoplazmatski, polno vezani itd.) (Emerson &

**Hewitt, 2005). Upotreba većeg broja** markera **doprinosi vjerodostojnosti** podataka **i olakšava** **otkrivanje hibridizacije, lateralnog** prenosa **gena, umnožavanja pseudogena i sličnih procesa koji mogu**

4

dovesti do pogrešnih zaključaka (Bermingham & Moritz, 1998).

**Cilj molekularno-filogenetičkih analiza je rekonstrukcija** srodničkih odnosa **i određivanje vremena koje** **je proteklo od trenutka kada su organizmi dijelili zajedničkog pretka. Konačni rezultat analiza je taksonomski dijagram**, tzv. **filogenetsko stablo, koje**

4

se sastoji od čvorova i grana. Čvorovi mogu biti spoljašnji (OTU - eng. Operational taxonomic units) i unutrašnji (HTU - eng. Hypothetical taxonomic units). Spoljašnji čvorovi predstavljaju taksone koje proučavamo, a unutrašnji njihovog hipotetičkog pretka (Hall, 2007). Način grananja predstavlja topologiju stabla, odnosno, odnose između potomaka i pretka.

**Filogenetsko stablo može biti ukorijenjeno i neukorijenjeno. Ukorijenjeno stablo sadrži čvor (korijen) koji** **predstavlja pretka svih taksonomskih jedinica koje proučavamo. Stabla se ukorjenjuju pomoću** spoljašnje grupe ( **eng. outgroup** ). Ona **nije član analiziranog taksona, ali je** sa **njim blisko** povezana.

4

**Neukorijenjena stabla predstavljaju srodničke odnose između taksona bez stvaranja hipoteza o zajedničkim precima (Hall, 2007)**

).

**U opisivanju filogenetskih odnosa između taksonomskih jedinica razlikujemo monofiletsku, parafiletsku i polifiletsku grupu**

4

. Monofiletska grupa se u sistematici naziva klada (eng. clade), i čine je članovi koji potiču od

**zajedničkog pretka, koji je karakterističan samo za tu grupu**. Parafiletska **grupa**

4

sadržži

**najmlađeg zajedničkog pretka ali ne i sve potomke tog pretka. Polifiletska grupa sadrži taksoni koji nisu evoluirali od zajedničkog pretka i nastaje kao rezultat pogrešne upotrebe homoplazijskih karakteristika u izradi filogenetskih stabala**

4

(Whiley & Lieberman, 2011). Osim korištenja većeg broja molekularno-genetičkih markera, veća vjerodostojnost molekularno-filogenetičkih analiza postiže se i upotrebom većeg broja različitih metoda za rekonstruisanje filogenetskih stabala.

**Metode za rekonstrukciju filogenetskih odnosa mogu se podijeliti na metode bazirane na distanci (eng. distance matrix) i metode bazirane na stanjima karaktera (eng. character state**

4

).

**Najčešće korištene metode filogenetske rekonstrukcije (Baxevanis & Oullette, 2001) su:**

- **Metoda susjednog sparivanja (NJ, eng. Neighbor joining) (Saitou i Nei, 1987)** bazira se na matrici udaljenosti i koristi strategiju postepenog grupisanja u klastere. Princip podrazumijeva pronalaženje susjednih taksonomskih jedinica kako bi na kraju minimalizovala ukupnu dužinu stabla.
- **Metoda najveće uštede (MP; eng. Maximum parsimony) (Swoford, 2001)** bazira se na stanjima karaktera i koristi strategiju iscrpnog pretraživanja

4

. Algoritam teži pronalasku stabla

za čiju je topologiju odgovoran minimalan broj evolutivnih promjena. • Metoda najveće vjerovatnoće (  ML; eng. Maximum likelihood) (Felsenstein, 1973, 1981 ) bazira se na stanjima karaktera kao i

MP. Algoritam proučava vjerovatnoću pojavljivanja svake nukleotidne baze ili aminokiseline u  predačkom izvoru

. • Bajesijanska

analiza (BA; eng. Bayesian analysis) (Mau et al. 1999 ) relativno je nova metoda stanja karaktera,  a bazira se na

vjerovatnoći

koje su procijenjene na osnovu nekog evolutivnog modela (eng. prior expectation). Metoda

DNK barkodinga u rekonstrukciji filogenetskih odnosa U klasičnoj morfološkoj identifikaciji vrsta, postoje četiri osnovna nedostatka (ograničenja): fenotipska i genetička plastičnost, problem kriptičnih vrsta, morfološke osobine karakteristične samo za određeni stadijum razvika i stručnost taksonoma (Waterton et al. 2013). Od kako je 2003. godine metoda DNK barkodinga predložena kao pouzdan način određivanja vrsta (Hebert et al. 2003), otkriveno je prisustvo novih ili ranije nezabilježenih vrsta protista, biljaka, gljiva i životinja. Metoda je uspješno zaživjela u naučnoj zajednici, što je dovelo do stvaranja brojnih međunarodnih inicijativa kao što je npr. International Barcode of Life (iBOL), koja obuhvata brojne institute, univerzitete i prirodjačke muzeje širom svijeta (preko 150 zemalja) (Valentini et al. 2009). Kako bi metoda DNK barkodinga uspješno funkcionisala, a u cilju boljeg upoređivanja podataka, neophodna je opsežna baza DNK barkodova sa priloženom morfološkom identifikacijom jedinki. Ratnasingham i Hebert (2007) uspostavili su BOLD bazu, koja korisnicima omogućava određivanje populacija, upravljenje podacima, analizu sekvenci i upotrebu bioinformatičke platforme za rekonstrukciju filogenetskih odnosa. 1.8 Filogeografija Filogeografija je oblast biogeografije, pomoću koje objašnjavamo uzroke i procese, koji određuju geografsku distribuciju populacija unutar vrsta ili srodnih vrsta (Avice et al. 1987). Pomoću filogeografije pokušavamo zaključiti kakav uticaj imaju istorijski i demografski procesi u populacijama, na sadašnju distribuciju genetskih osobina organizama. Iz tog razloga, u filogeografske analize treba uključiti znanja iz molekularne genetike, paleontologije, filogenetske

biologije, historijske geografije i geologije (Avice, 2000). Osnovna jedinica u filogeografskim studijama je monofiletska grupa ili klada, koja je dobijena filogenetskom analizom. Među najčešće korišćenim markerima su segmenti mitohondrijske DNK, ali se mogu koristiti i drugi markeri. Mitohondrijska DNK se lako izoluje, ima jednostavnu genetsku strukturu, visoku stopu mutacije i nasljeđuje se majčinski. Zbog toga je vrlo upotrebljiv marker za rekonstrukciju filogeografske istorije vrsta i za rekonstrukciju evolutivnih događaja (Avice, 2000). Jedan od temelja upotrebe mitohondrijske DNK u filogeografskim studijama je teorija slivanja ili srastanja (eng. coalescent theory). To je populacioni model neutralne evolucije, na osnovu koga svi mitohondrijski haplotipovi potiču od zajedničkog pretka. Koalescenca je model isključivanja linija iz genetičkog drifta, koji omogućava pogled u prošle događaje, koji vode do zajedničkih predaka (Harding 1996). Što su organizmi ili geni sličniji, kraće je vrijeme koalescence, i samim tim vrijeme do zajedničkog pretka. Na vrijeme koalescence utiče veličina recentne populacije i prethodni demografski događaji. Geografski raspored populacija možemo objasniti pomoću dvije pojave: vikarijantnosti i disperzije. Usljed vikarijantnosti dolazi do izolacije genetskih klada zbog geografskih prepreka. Pomoću ovog procesa dobijamo odvojene populacije sa različitim genetskim sastavom, koje se mogu razviti do samostalnih vrsta ili ponovo uspostaviti kontakt. Pomoću disperzije, vrsta se šire iz užeg na druga, za preživljavanje primjerena područja. U tom slučaju dolazi do diferencijacije vrsta zbog razvrstavanja linija i/ili genetičkog drifta, ali i do izolacije zbog udaljenosti. U evolucionim procesima, pojave vikarijantnosti i disperzije se prepliću.

1.9 Ciljevi rada Porijeklo faune sliva Skadarskog jezera još uvijek je neistraženo. Glavna hipoteza, koju su nedavno formulisali Grabowski et al. (2018) pretpostavlja da je "jezero i njegov bazen mogao biti kolonizovan setom široko rasprostranjenih linija sa visokim disperzivnim sposobnostima koje nastanjuju lakustrična staništa širom Balkana, ili da je bilo kolonizovano uglavnom iz malih lokalnih vodenih tijela povezanih sa limnokrenim izvorima ili močvarama". Isti autori ukazuju da je Skadarsko jezero mlado vodeno tijelo, koje nema endema ni na nivou vrsta ni na nivou intraspecifične raznolikosti. Sa druge strane, bazen Skadarskog jezera sa sistemom okolnih kraških izvora, bio je izolovan tokom većeg dijela svoje istorije. Tokom ovog vremenskog perioda, koji je procijenjen na više od 2.5 miliona godina, stvorili su se uslovi za prisustvo velikog broja endema, kako na nivou vrsta, tako i na nivou filogenetskih linija (potencijalno kriptične i pseudokriptične vrste). Smatra se da su kraški izvori u ovom području, vjerovatno izolovani stotinama hiljada godina, što je pojačalo nastanak divergentnih i lokalnih endemskih linija, potencijalno i vrsta (Grabowski et al. 2018). Da bi se utvrdio stvarni nivo endemizma lokalne faune, neophodno je izvršiti detaljne filogenetičke i filogeografske analize kod brojnih grupa životinja (npr. riba, pijavica, akvatičnih insekata itd.). Ove grupe do sada su gotovo isključivo proučavane na morfološkom nivou, ali je malo poznato o njihovoj molekularnoj raznovrsnosti i filogenetskim / biogeografskim afinitetima. Iako je znanje o rasprostranjenosti i diverzitetu pijavica i vodenih grinja u Crnoj Gori unaprijeđeno u posljednjih dvadeset godina, malo se zna o njihovom populaciono molekularnom diverzitetu. U ovoj disertaciji, pijavice porodice Glossiphoniidae (Hirudinea) i vodene grinje Hydrachnidia (Acari), predstavljaju model organizme u procjeni diverziteta lokalne faune primjenom integrativnog pristupa, koji kombinuje morfološke i molekularne podatke. Ova analiza sprovedena je sa sljedećim postavljenim ciljevima:

- objasniti filogenetske i filogeografske odnose istraživanih populacija pijavica i vodenih grinja na osnovu analize fragmenata mitohondrijskog COI gena.
- testirati primjenjivosti molekularnih metoda, prvenstveno DNK barkodinga na rasvijetljavanju filogenetskih odnosa ovih grupa beskičmenjaka.
- dopuniti javno dostupnu BOLD bazu podataka sa DNK barkodovima pijavica i vodenih grinja sa područja Crne Gore i uporediti ih sa drugim javno dostupnim barkodovima.
- stvoriti pouzdanu DNK bazu podataka, koja je preduslov za primjenu savremenih metoda procjene stanja slatkovodnih ekosistema.

2. MATERIJALI I METODE 2.1.1 Područje istraživanja Sliv Skadarskog jezera predstavlja jedan od najraznovrsnijih i najinteresantnijih prostora Balkanskog poluostrva (Slika 12 i 13).

Osim toga, jedno je od najbogatijih slatkovodnih područja na svijetu, sa prosječnom izdašnošću od 54 l/s/km<sup>2</sup> (Radulović M. et al. 2015, Radulović M. 2018). Površina Skadarskog jezera iznosi 5.631 km<sup>2</sup>, od čega 81 % pripada teritoriji Crne Gore, a nešto preko 1000 km<sup>2</sup> Albaniji (Radulović M. et al. 2015). Prema jugozapadu i zapadu graniči se sa slivom Crnogorskog primorja i slivom rijeke Trebišnjice; prema sjeveru i sjeveroistoku sa slivovima rijeke Pive, Tare i Lima, a sa jugoistoka sa slivom rijeke Drim (Radulović V. 1983). Slika 12. Pogled sa Bobije na Skadarsko jezero (fotografija: Zlatko Pavićević) Za današnju geomorfologiju bazena Skadarskog jezera od značaja su mnoge riječne doline, a najveći priliv jezeru daje rijeka Morača sa pritokama (oko 63%) (Radulović M. et al. 2015). Znatne količine vode jezero dobija i podzemnim putevima, preko niza sublakustričnih izvora, tzv. „oka“. Pražnjenje jezerskog bazena vrši se direktno isparavanjem i rijekom Bojanom, kojom jezero otiče u Jadransko more. Pod određenim hidrološkim uslovima, neposredno slivno područje Skadarskog jezera uvećava se vodama iz slivova rijeka Drima i Bojane. Skadarsko jezero smatra se kriptodepresijom jer su mu neke površine dna ispod morskog ogleдалa (Bešić & Mihailović, 1983), sa najnižom tačkom oko 2.5 m ispod nivoa mora (ne računajući dubinu „oka“) (Radojičić 2005). Najdublje je Raduško „oko“, čija najdublja tačka iznosi 72.5 m (Barović et al. 2018). Prosječna dubina jezera kreće se između 4.4 i 8.3 m (Radulović M. et al. 2015). Skadarsko jezero je suptropsko, sa najnižom prosječnom vrijednošću temperature vode 4.2 °C, i najvišom 27.5 °C (Karaman & Beeton 1981). Slika 13. Mapa sliva Skadarskog jezera (autor: Peter Glöer, preuzeto i modifikovano iz Pešić et al. 2018b)

### 2.1.2 Paleogeografska istraživanja Relativno veliko slivno područje Skadarskog jezera obuhvata sve tipske geološke karakteristike cijelog prostora južnih Dinarida:

**od vrlo starih paleozojskih i mezozojskih sedimentnih i metamorfnih stijena sa brojnim magmatskim eruptivima (na sjevernom dijelu sliva), do isključivo karbonatnih stijena u njegovom centralnom i južnom dijelu**

23

(Karaman & Beeton 1981, Glavatović & Radusinović, 2011). Poznavanje geološke istorije sliva Skadarskog jezera od posebnog je značaja za razumijevanje geološkog sastava i tektonskog sklopa, a samim tim i za očuvanje biodiverziteta i upravljanje hidrološkim režimom ovog područja. Bez obzira na brojne studije kojima se došlo do podataka o geološkoj građi, shvatanja o paleogeografskoj evoluciji ovog terena značajno su se mijenjala tokom posljednjih decenija (Radulović V. 1983, Radulović M. 2018, Grabowski et al. 2018). Nedavna studija od strane Mazzini et al. (2015) pokazala je da se Skadarsko jezero može smatrati veoma mladim vodenim tijelom, koje je nastalo prije 1200 godina od slatkovodnih močvara i izvora koji su bili na njegovom sadašnjem mjestu. U doba Rimljana, a vjerovatno i ranije, močvarno područje zauzimalo je današnji položaj jezera. Prema istim autorima, evolucija do trajnog jezera nije povezana sa globalnim ili lokalnim klimatskim događajima, već sa povećanjem nivoa mora duž istočne obale Jadrana i varijacijama toka rijeke Drim. Rekonstrukcija koju su predložili Mazzini et al. (2015), poklapa se sa istorijskim zapisima o ovom području. Italijanski humanista i istoričar Merula (1474), po prvi put u svojim zapisima u XV vijeku navodi postojanje Skadarskog jezera. Od 1513. godine, ono je uvijek zastupljeno na geografskim kartama, kako navodi i Jireček (1916) u svom eseju o istoriji Skadra tokom srednjeg vijeka. Sa druge strane, nesumnjivo je da bazen Skadarskog jezera sa sistemom okolnih kraških izvora mnogo stariji i da postoji mnogo duže od današnjeg jezera (Grabowski et al. 2018). Prema pomenutim autorima, nastao je prije više od 2.5 miliona godina i tokom svoje istorije bio je izolovan, što je uslovalo postojanje velikog broja krenalnih i fluvijalnih endema, na nivou morfo-vrsta a i na nivou genetičkih linija



(eventualno kriptične i pseudokriptične vrste). 2.1.3 Limnološka istraživanja Prva kontinuirana istraživanja Skadarskog jezera započela su 1952. godine, osnivanjem Ribarske stanice Narodne Republike Crne Gore, sa ciljem monitoringa i naučnog proučavanja Skadarskog jezera (Pešić et al. 2018b). Ona je transformisana 1965. godine, u biološku stanicu Instituta za biološka i medicinska istraživanja. Od 1973. godine, ova naučna jedinica djeluje u okviru Univerziteta „Veljko Vlahović“. 90-ih godina prošlog vijeka transformisana je u Odsjek za biologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta Crne Gore, koji je osim naučnih istraživanja preuzeo i obrazovnu ulogu (Pešić et al. 2018b). Limnološka istraživanja i procjena biodiverziteta Skadarskog jezera, kroz saradnju Vlade Jugoslavije i Sjedinjenih Američkih Država (SAD), započela su 1972. godine, u okviru projekta „Limnološka istraživanja Skadarskog jezera“. Projekat je trajao pet godina (1972-1977), i doprinio je objavljivanju publikacije „The Biota and Limnology of Lake Skadar“ koja sadrži fundamentalne informacije o ovom području (Karaman & Beeton, 1972). Tokom posljednje četiri decenije, prikupljena su dodatna znanja o hidrologiji i biodiverzitetu bazena Skadarskog jezera (Radulović V. 1997, Bošković 2004, APAWA & CETI 2007). Najnovija knjiga „The Skadar/Skodra Lake Environment“, koja je objavljena 2018. godine, sadrži sistematizovane podatke o ovom području kroz 23 poglavlja iz različitih naučnih disciplina (Pešić et al. 2018b).

2.1.4 Filogenetska istraživanja Na području sliva Skadarskog jezera, detaljne taksonomske/filogenetske analize, koja uključuje morfološke i molekularne analize, rađene su za samo nekoliko grupa beskičmenjaka. Najveći broj studija vezan je za faunu rakova iz grupe Malacostraca (Sworobowicz 2015, Wysocka et al. 2017, Jabłońska 2018) i hidrobidne puževe (Falniowski et al. 2012). Sworobowicz (2015) i Wysocka et al. (2017) proučavali su evropskog slatkovodnog izopodnog račića *Asellus aquaticus* i utvrdili da je bazen Skadarskog jezera kolonizovan u kasnom pliocenu/ranom pleistocenu od lokalne jugoistočno-evropske mitohondrijske DNK linije. Grabowski et al. (2018) utvrdili su da je široko rasprostranjeni balkanski amfipodni račić *Gammarus roeselii*, u Skadarskom bazenu predstavljen sa dvije linije, jednom lokalnom endemskom i drugom koja je vjerovatno porijeklom iz Ohridskog jezera. Jabłońska et al. (2018) opisali su novu vrstu slatkovodnih kozica, *Atyaephyra vladoi*, čija je distribucija povezana sa sublakustričnim izvorima u Crnoj Gori. Sve navedene studije pokazale su odsustvo tipičnih lakustričnih endema.

2.2 Uzorkovanje i morfološke analize pijavica U periodu od 2018. do 2019. godine, sakupljanje pijavica porodice Glossiphoniidae u slivu Skadarskog jezera, sprovedeno je na sedam lokaliteta (Tabela 5, Slika 14, 15 i 16). Tokom terenskog istraživanja zabilježeni su podaci o prikupljenim vrstama, području istraživanja i korištenoj metodi sakupljanja. Mjesta uzorkovanja su fotografisana i zabilježene su geografske koordinate. Svi sakupljeni uzorci konzervirani su u 96% etanolu, kako bi se omogućile morfološke i molekularno genetičke analize. Tabela 5: Nazivi lokaliteta, nadmorska visina i tip staništa na kojima su sakupljene pijavice. Oznaka Naziv (grad / naselje / lokalitet) Nadmorska visina Tip staništa 1 Danilovgrad, Dobro polje 56 m reo-limnokreni izvor 2 Danilovgrad, Oraška jama 56m pećinski izvor 3 Podgorica, Crno oko 38 m limnokreni izvor 4 Danilovgrad, Mareza 38 m limnokreni izvor 5 Cetinje, Rijeka Crnojevića 9 m lotičko stanište 6 Cetinje, Karuč 12 m sublakustrični izvor 7 Tuzi, Vitoja 9 m reo-limnokreni izvor Slika 14. Mapa Crne Gore sa označenim lokalitetima u slivu Skadarskog jezera na kojima su sakupljeni uzorci pijavica (označeno tačkama; popisi lokaliteta su u tabeli 4). Mapa je kreirana u softveru QGIS ver. 2.8.11. Slika 15. (lijevo) Karuč, sublakustrični izvor (fotografija: M. Jovanović) Slika 16. (desno) Crno oko, limnokreni izvor (fotografija: M. Jovanović) Pijavice koje pripadaju porodici Glossiphoniidae prikupljene su ručno pomoću pinceta ili pomoću ručnih mrežica sa tvrde podloge (kamenje, drveće), biljaka potopljenih u vodi i/ili sa obala (Slika 17). Morfološka analiza do nivoa vrste izvršena je pomoću identifikacionih ključeva (Nesemann & Neubert, 1999, Grosser et al. 2016). Slika 17. Sakupljanje pijavica (slika lijevo – ručno sakupljanje (fotografija: Ana Manović), slika desno i dolje – sakupljanje ručnom mrežicom (fotografija: Ana Manović, Milica Jovanović). Osim u slivnom području Skadarskog jezera,

pijavice su sakupljene sa petnaest lokaliteta iz šest evropskih zemalja: Albanije, Austrije, Bosne i Hercegovine, Kosova, Njemačke i Sjeverne Makedonije (Slika 18). Neki od navedenih lokaliteta su tipski (lat. locus typicus), sa kojih su vrste *G. nebulosa* (potok Nieplitz, Berlin, Njemačka) i *G. balcanica* (izvor Toplla, Dečani, Kosovo) prvi put opisane za nauku (Nesemann & Neubert 1999, Grosser et al. 2016). Značajan dio materijala prikupljen je na području Ohridskog i Prespanskog jezera (Sjeverna Makedonija i Albanija) u septembru 2019. godine. Ovo područje je odabrano, jer ga odlikuje nekoliko endemičnih taksona pijavica (npr. *G. complanata maculosa* i *G. pulchella*). Osim toga, od posebnog značaja je dio morfološki identifikovanog materijala pijavica iz roda *Glossiphonia*, koji je preuzet iz zbirke Prirodnjačkog muzeja u Beču (NHM), kako bi se obezbijedio pouzdan set podataka za dalje molekularno genetičke analize. Na kraju, u konačan set podataka uvrštene su i javno dostupne sekvence iz banke gena (eng. GenBank) kako bi se uporedile sa sekvencama dobijenim u ovom istraživanju (Slika 18). Slika 18. Mapa šireg područja sa lokalitetima na kojima su sakupljene pijavice (crvene tačke označavaju nalaze iz ovog rada, a plave iz prethodnih radova (gdje su koordinate bile dostupne)). Istaknuti su kodovi zemalja (

**ALB-Albanija, BiH-Bosna i Hercegovina, KOS-Kosovo** , MK-Sjeverna **Makedonija** , CG- **Crna Gora** 42

, AUS-Austrija, GER-Njemačka). Mapa je kreirana u softveru QGIS ver. 2.8.11. 2.3 Molekularno genetičke analize pijavica

**Sa ciljem utvrđivanja** filogenetskih **odnosa odabranih vrsta** pijavica, izvršene **su molekularne** 6  
genetičke **analize** u Laboratoriji **za**

molekularnu sistematiku, Prirodnjačkog muzeja u Beču (NHM). Iz prikupljenih uzoraka izdvojene su jedinke iz kojih je izolovana DNK. DNK ekstrakti, nakon izvršene izolacije, zamrznuti su na - 80°C u Laboratoriji za molekularnu sistematiku, a vaučeri (eng. voucher – pojedinačna životinja koja služi kao dokazni materijal), sačuvani u DNK zbirci Prirodnjačkog muzeja u Beču, kao dokazni muzejski material (Slika 19). Odabran je gen koji kodira subjedinicu citohrom oksidaze mitohondrijske DNK (eng. COI), a koji je već korišten u sličnim istraživanjima. Mitohondrijski fragment gena za podjedinicu 1 citohrom c oksidaze (COI), predložen je kao standardan region za DNK barkoding unutar carstva životinja. Mitohondrijska DNK (mtDNK) smještena je unutar mitohondrija koje nalazimo u svim ćelijama životinjskog tkiva. U pitanju je dvolančani kružni molekul koji sadrži nekodirajući region ("D-petlja") i kodirajući region, na kome se nalazi 37 gena različite funkcije i brzine evolucije (Wolstenholme 1992). Prednosti COI gena u odnosu na druge molekularno-genetičke markere su izostanak introna (za razliku od nuklearne DNK), kao i to što nema insercije i delecije (za razliku od 12S, 12S RNK). Slika 19. Lijevo – pojedinačni vaučer. Slika desno – skladištenje vaučera koji čine zbirku vaučera NHM. Za sve jedinke iz kojih je uspješno izolovana DNK, podaci sa svim relevantnim informacijama uneseni su u BOLD bazu (

**The Barcode of Life Data Systems – BOLD** Systems ver. 4; <http://www.boldsystems.org> 11

). 2.3.1 Izolacija DNK, PCR amplifikacija, elektroforetsko razdvajanje fragmenata DNK i sekvencioniranje gena mtDNK pijavica Pijavice fiksirane u 96% etanolu čuvane su na temperaturi 4 °C do izolacije DNK. Uzorci mišićnog tkiva (približno 2 x 2 x 2 mm), odvojeni su pomoću sterilnih skalpela i pinceta sa zadnjeg dijela tijela odabranih jedinki. Pri tome se vodilo računa da se ne presijeku unutrašnji organi pijavica, jer mogu sadržati tkiva drugih vrsta, što bi dovelo do kontaminacije DNK. Prije početka izolacije DNK iz svake pojedinačne životinje, uzet je novi sterilni skalpel, po potrebi i nove rukavice, a pincete smo neprekidno čistili sa 96 % etanolom i papirnim ubrusima.

**Izolacija genetičkog materijala** izvršena je pomoću **DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen** , 6  
Hilden, Njemačka) **prema** priloženim **uputstvima proizvođača**

. Konačna zapremina rastvora DNK iznosila je 40 µL. Liza tkiva: • uzorke mišićnog tkiva lizirali smo u 180 µL pufera za liziranje (ATL) •

**lizatu smo dodali 20 µL proteinaze K (20 mg/ml)**

47

), vorteksovali i i inkubirali u termomikseru na 56 °C do kompletnog liziranja tkiva. Nastavak protokola DNK izolacije: • u lizat smo dodali 200 µL pufera AL i vorteksovali sadržaj 10-15 sekundi • u lizat smo dodali 200 µL 96 % etanola i vorteksovali sadržaj 10-15 sekundi • smješu lizata prenijeli smo u u kolone sa silikatnom gel membranom (DNeasy Mini spin column) i tubicama (centrifugirkama) od 2 ml • sadržaj je centrifugiran jedan minut na 8000 obr/min; filtrat je odstranjen • gornji dio kolone (spin column) prenijeli smo u novu centrifugirku od 2 ml • kolone smo isprali sa 500 µL pufera za ispiranje (AW1) (»Wash Solution 1«) • sadržaj je centrifugiran jedan minut na 8000 obr/min; filtrat je odstranjen • gornji dio kolone (spin column) prenijeli smo u novu centrifugirku od 2 ml • kolone smo isprali sa 500 µL pufera za ispiranje (AW2) (»Wash Solution 2«) • sadržaj je centrifugiran tri minuta na 14000 obr/min; filtrat je odstranjen • centrifugiranje je ponovljeno još jednom (»dry centrifugation«) • posljednji korak je ispiranje sa 30 µL pufera AE (»Elution Solution«); inkubacija jedan minut na sobnoj temperaturi; centrifugiranje jedan minut na 8000 obr/min. Umnožavanje (eng. amplification)

**izolovanog genetičkog materijala** izvršeno je **lančanom reakcijom polimeraze (PCR eng. Polymerase** 6  
**Chain Reaction**

).

**PCR predstavlja brzu, specifičnu i osjetljivu metodu** umnožavanja **odabranih** DNK fragmenata **u in** 4  
**vitro**

uslovima. Umnožen je COI region ukupne dužine ~ 708 baznih parova (eng. base pair - bp). Oligonukleotidni prajmeri (početnice) korišćeni za umnožavanje fragmenta DNK su:

**LC01490, 5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3 ' i HCO2198, 5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3' (Folmer et al. 1994**

2

). Prajmer za smjer 5' prema 3' predstavlja "forward", a u smjeru 3' prema 5' "reverse". Amplifikacija fragmenta

**DNK PCR reakcijom odvija se u nekoliko koraka. U prvom koraku dolazi do denaturacije dvolančanog molekula DNK pod uticajem visoke temperature (94 °C). U drugom koraku temperatura se snižava do 52 °C i prajmeri naliježu na kompatibilna mjesta na jednolančanoj DNK. U trećem koraku, pomoću enzima polimeraze umnožava se komplementarni lanac DNK**

6

pri 72 °C.

**Ova tri koraka ponavljaju se ciklično 35 puta, što rezultira velikim brojem kopija željenog produkta zbog eksponencijalne prirode reakcije** PCR

4

. Posljednji korak je hlađenje uzoraka,

**kojim se omogućava kratkoročno čuvanje reakcijske smješe dok se epruvete ne preuzmu iz PCR uređaja**

4

(Tabela 6). Tabela 6: Uslovi PCR reakcije

Korak PCR reakcije	Temperatura / °C	Vrijeme	Broj ciklusa	Početna denaturacija
Denaturacija	94	30s	1	35
Hibridizacija	52	30s		
Elongacija	72	1min		
Konačna elongacija	72	7min		
Hlađenje	10	∞		

Svaka PCR reakciona smješa sastojala se od 1 µL destilovane vode (eng. nuclease free water), 0,1 µL TopTaq DNK polimeraze, 2,5 µL 10x TopTaq PCR pufera, 10 mM svakog dNTP (dezoksiribonukleotid trifosfat), 50 µM svakog prajmera i 1 µL DNK za 25 µL ukupne zapremine reakcione smješe (Tabela 7). Ukoliko PCR produkt nije dobijen ovim odnosom zapremine standarda za PCR i zapremine DNK, povećana je zapremina DNK.

**Prilikom svake PCR reakcije, korištena je negativna kontrola koja je**

28

umjesto DNK sadržala

**vodu, a služila je kao kontrola potencijalne kontaminacije pojedinih** hemikalija **i pribora**

4

. Tabela 7: Sastav PCR reakcione smješe od 25 µl Reagensi Zapremina ddH<sub>2</sub>O (AD) 20,4 µl 10xTopTaq PCR Pufer 2,5 µl dNTP miks (10 mM po jednom) 0,5 µl Prajmer A (50 µM) 0,25 µl Prajmer 2 (50 µM) 0,25 µl TopTaq DNK Polimeraza 0,1 µl DNK 1 µl UKUPNO: 25 µl Uspješnost PCR reakcije provjerena je metodom elektroforeze u agaroznom gelu.

**Elektroforeza je metoda koja** omogućava **razdvajanje molekula** DNK po dužini **pod** uticajem jednosmjernog **električnog polja. Negativno** naelektrisani DNK molekuli **kreću se od negativne katode prema pozitivnoj anodi**

4

, pri čemu kraći molekuli putuju brže kroz gel. Za potrebe ovog rada korišten je 1%-tni

**agarozni gel**, koji **je pripremljen rastvaranjem 1 g agaroze u 100 ml 1x TBE pufera (tris**

19

-borat etilendiamintetraoktenu kiselina) sa 100 µl etidijum bomida

**koncentracije 0,5 µg/ml**. Etidijum **bromid je boja koja interkalira**

10

u molekul DNK i omogućava vizualizaciju fragmenata DNK pod uticajem UV zračenja.

**Na gel se nanosilo 5** µg pojedinačnog **uzorka. Elektroforeza se** odvijala **u 1 x TBE puferu** na **120 V, u trajanju** od 30 **minuta. Veličina** DNK **fragmenata određivana je pomoću elektroforetskog standarda poznate veličine fragmenata. Nakon elektroforeze gel je vizualiziran na UV** transiluminatoru **i fotografisan digitalnim fotoaparatom (Slika 20). Slika**

4

20. Provjera kvaliteta dobijenih PCR produkata pijavica nakon elektroforeze. Za prečišćavanje proizvoda amplifikacije, korišten je QIAquick PCR komercijalni kit za prečišćavanje (Qiagen, Hilden, Njemačka) prema priloženim uputstvima proizvođača. Sekvencioniranje je izvedeno u oba smjera (smjer "forward" i "reverse") u komercijalnom servisu Microsynth-u (Balgach, Švajcarska), pomoću forward (LCOI) i reverse (HCOI) prajmera, koji su korišteni u amplifikaciji fragmenata DNK. 2.4 Uzorkovanje i morfološke analize vodenih grinja U periodu od 2018. do 2021. godine, vodene grinje sakupljene su na lentičkim i

lotičkim staništima na području sliva Skadarskog jezera. Uzorkovanje je vršeno na dvadeset osam lokaliteta (Slika 21). Mjesta uzorkovanja su fotografisana i zabilježene su geografske koordinate (Slika 22, 23 i 24). Sakupljanje vodenih grinja sprovedeno je u okviru projekta „DNA-Eco“ („DNA barkod referentna biblioteka kao alat za održivo upravljanje ugroženim slatkovodnim ekosistemima u slivu Skadarskog jezera“), podržanog od strane Ministarstva nauke Crne Gore. Slika 21. Mapa Crne Gore sa lokalitetima u slivu Skadarskog jezera, na kojima su potvrđeni nalazi vodenih grinja (označeno tačkama; nazivi lokaliteta navedeni su u tabeli 7). Mapa je kreirana u softveru QGIS 2.8.11. Slika 22. (lijevo gore) Moromiš, temporalna bara (fotografija: M. Jovanović) Slika 23. (lijevo dolje) Rijeka Crnojevića, donji tok rijeke (fotografija: M. Jovanović) Slika 24. (desno) Donja Plavnica (donji tok rijeke) (fotografija: V. Pešić) Uzorkovanje je vršeno pomoću ručnih mrežica promjera okaca 500 µm. Materijal je sačuvan u 96% etanolu i transportovan u Laboratoriju za biodiverzitet, Prirodno- matematičkog fakulteta, gdje je prema dostupnoj literaturi (

**Bartsch et al. 2007, Di Sabatino et al. 2010, Gerecke et al. 2016**

29

), identifikovan do nivoa morfo-vrsta. Jedinke vodenih grinja fotografisane su prije molekularno-genetičkih analiza. Tabela 8: Nazivi lokaliteta, nadmorska visina i tip staništa u slivu Skadarskog jezera na kojima su sakupljene vodene grinje. Oznaka Naziv (grad / naselje / lokalitet) Nadmorska visina Tip staništa 1 Nikšić, Vidrovan, Vukovo vrelo 663 m reo-limnokreni izvor 2 Nikšić, izvor u selu Miločani 620 m reokreni izvor 3 Nikšić, planina Lukavica, izvor „Babino sicelo“ 1607 m limnokreni izvor 4 Nikšić, planina Lukavica, bare 1497 m limnokreni izvor 5 Kolašin, izvor kod manastira Morača 295 m reokreni izvor 6 Danilovgrad, rijeka Zeta, Slap 38 m reo-limnokreni izvor 7 Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta 43 m reokreni izvor 8 Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž 39 m reokreni izvor 9 Danilovgrad, izvor Mareza 31 m reokreni izvor 10 Podgorica, Mareza, kanal 32 m limnokreni izvor 11 Danilovgrad, Svinjiška vrela 94 m reokreni izvor 12 Danilovgrad, bara Moromiš 53 m temporalna bara 13 Podgorica, rijeka Zeta, Pričelje 38 m reo-limnokreni izvor 14 Danilovgrad, rijeka Zeta, Vranjske njive 34 m reokreni izvor 15 Podgorica, rijeka Morača 24 m donji tok rijeke 16 Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša 80 m donji tok rijeke 17 Podgorica, rijeka Cijevna, Trgaja 78 m donji tok rijeke 18-19 Cetinje, Rijeka Crnojevića 9 m donji tok rijeke 20 Bar, Poseljanski izvor 19 m reokreni izvor 21 Bar, Poseljanski potok 11 m potok 22 Bar, rijeka Orahovštica 5 m donji tok rijeke 23 Bar, izvor u selu Godinje 91 m reokreni izvor 24 Bar, Skadarsko jezero, Murići 8 m litoralna zona jezera 25 Podgorica, Skadarsko jezero, donja Plavnica 6 m donji tok rijeke 26 Podgorica, Skadarsko jezero, gornja Plavnica 9 m donji tok rijeke 27 Tuzi, Vitoja, izvor 9 m reo-limnokreni izvor 28 Tuzi, Vitoja, bazen 9 m limnokreni izvor 2.5 Molekularno genetičke analize vodenih grinja Molekularno genetičke analize većeg dijela prikupljenog materijala vodenih grinja izvršene su prateći standardni protokol za DNK ekstrakciju (

**Ivanova et al. 2007** ), PCR reakciju ( **Ivanova & Grainger 2007a** ) i sekvencioniranje ( **Ivanova & Grainger 2007b**

3

) u Kanadskom centru za DNK barkoding - CCDB (Guelf, Kanada; <http://ccdb.ca/>, Slika 25). Manji dio prikupljenog materijala vodenih grinja analiziran je tokom studijskog boravka u Laboratoriji za biogeografiju i ekologiju invertebrata, Univerziteta u Lođu

(Łódź) Poljska, u februaru 2020. godine. Slika 25. Šematski prikaz toka DNK barkodiranja (1. DNK izolacija, 2. PCR amplifikacija, 3. sekvencioniranje PCR produkata, 4. poređenje dobijenih sekvenci sa referentnom bazom podataka) (preuzeto od IBOL – International Barcode of Life <https://ibol.org/about/dna-barcoding>). Ciljan

**je region mitohondrijske DNK koji kodira citohrom oksidazu I (COI)**

6

), a on se uz 18S i 28S ribozomalne jedarne markere, najčešće koristi za rekonstrukciju filogenetskih odnosa unutar grupe Hydrachnidia (Dabert et al. 2016, Blattner et al. 2019). DNK ekstrakti, nakon izvršene izolacije, zamrznuti su na  $-80^{\circ}\text{C}$  u Centru za Biodiverzitet i Genomiku (CBG; [www.biodiversitygenomics.net](http://www.biodiversitygenomics.net)), a vaučeri vraćeni Studijskom programu za Biologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta (UCG), gdje su skladišteni. Izolacija DNK vodenih grinja je nedestruktivna metoda, što je od posebnog značaja u slučajevima dodatne morfološke provjere barkodiranog materijala. Pojedini vaučeri secirani su prema (Davids et al. 2007), a preostali su skladišteni u "Koenike" medijumu. Ova smješa glicerina – glacijalne sirćetne kiseline – destilovane vode, u odnosu 5:2:3, predstavlja najčešće upotrebljavani fiksativ za dugotrajno čuvanje vodenih grinja. 2.5.1 Izolacija DNK, PCR amplifikacija, elektroforetsko razdvajanje fragmenata DNK i sekvencioniranje gena mtDNK vodenih grinja U Laboratoriji za biogeografiju i ekologiju invertebrata u Lođu, DNK je ekstrahovana neinvazivnom metodom pomoću Gene MATRIX Tissue DNA Purification Kit (EURx), prema uputstvima proizvođača. Liza tkiva: Jedinke su odvojene od 96 % etanola i isušene pomoću filter papira. Inkubacija pomoću pufera T, proteinaze K i Rnaze A izvršena je u trajanju od 3 h na  $56^{\circ}\text{C}$ . Nakon toga, jedinke vodenih grinja odvojene su od digestionog pufera i sačuvane u 96 % etanolu za dalje morfološke analize. Nastavak protokola DNK izolacije vodenih grinja: • u lizat je dodato 350  $\mu\text{l}$  Sol T pufera; sadržaj je promiješan, vorteksovan i inkubiran deset minuta na  $70^{\circ}\text{C}$  • u lizat je dodato 350  $\mu\text{l}$  96 % etanola • sadržaj je vorteksovan i centrifugiran jedan minut na 10000 obr/min • 600  $\mu\text{l}$  ovog sadržaja prenjeto je u tubice sa silikatnom gel membranom (spin column), u koje je prethodno dodato 350  $\mu\text{l}$  aktivacionog pufera T • sadržaj je centrifugiran jedan minut na 10000 obr/min; iz sabirne epruvete odstranjen je filtrat • preostali lizat prenesen je u nove tubice i centrifugiran 2 minuta na 10000 obr/min. Zatim je još jednom ponovljen postupak odlivanja filtrata • dodato je po 500  $\mu\text{l}$  pufera za čišćenje (Wash TX1) i (Wash TX2), koje je pratilo centrifugiranje od 2 min na 10000 obr/min i odlivanje filtrata • posljednji korak je dodavanje 50  $\mu\text{l}$  prethodno ugrijanog pufera za ispiranje na silikatnu gel membranu kolona. Nakon inkubacije od 2 minuta na sobnoj temperaturi, tubice su centrifugirane jedan minut na 10000 obr/min. Na kraju, postupak centrifugiranja ponovljen je još jednom. Ekstrahovana DNK skladištena je u na temperaturi od  $2 - 8^{\circ}\text{C}$  kako bi se omogućila PCR amplifikacija ciljanog regiona. Lančana reakcija polimeraze (PCR reakcija) izvršena je korišćenjem prajmera:

**LCO1490-JJ (5'-CHACWAAYCATAAAGATATYGG-3' ) i HCO2198-JJ (5'-AWACTTCVGGRTGVCCAAARAATCA-3'**

44

). Protokol za pripremu PCR reakcije smješe od 20  $\mu\text{l}$ : 4,8  $\mu\text{l}$  dd H<sub>2</sub>O 10  $\mu\text{l}$  10 x PCR pufera 1,6  $\mu\text{l}$  + 1,6  $\mu\text{l}$  prajmera (LCOJJ © HCOJJ) 2  $\mu\text{l}$  ekstrahovane DNA Vremensko temperaturni program PCR reakcije činili su: Početna denaturacija  $94^{\circ}\text{C}$  3 min

Denaturacija Hibridizacija Elongacija Denaturacija Hibridizacija Elongacija Konačna elongacija Hlađenje 94 °C 45 °

**C 72 °C 94 °C 51 ° C 72 °C 72 °C ∞ 30 s 1 min**

38

30 s 60 s 5 ciklusa 30 s 1 min 30 s 60 s 35 ciklusa 5 min 10 min

**Uspješnost PCR reakcije provjerena je** metodom elektroforeze **u** agaroznom **gelu. Korišten je 1 % - 9**  
**tni agarozni gel, koji je**

**pripremljen rastvaranjem 1 g 51 i jeka 51 e u 100 ml 1x TBE pufera (tris**

19

-borat etilendiamintetraoktenu kiselinu) sa 100 µl etidijum bromida koncentracije 0,5 µg/ml.

**Na gel se nanosilo 5 µg** pojedinačnog **uzorka. Elektroforeza se** odvijala **u 1 x TBE puferu** na **4**  
**120 V, u trajanju** od 30 **minuta. Veličina DNK fragmenata određivana je pomoću elektroforetskog**  
**standarda poznate veličine fragmenata. Nakon elektroforeze gel je vizualiziran na UV** transluminatoru **i**  
fotografisan **digitalnim fotoaparatom (Slika 26). Slika**

26. Provjera kvaliteta dobijenih PCR produkata vodenih grinja nakon elektroforeze. PCR produkti poslani su na čišćenje i na sekvencioniranje (u jednom smjeru) u komercijalni servis Naturalis Biodiversity Center (Lejden, Holandija). Analiza je izvedena Sangerovom metodom, upotrebom prajmera koji su korišteni u amplifikaciji fragmenata DNK. 2.6 Bioinformatičke analize 2.6.1 Bioinformatičke analize pijavica 2.6.1.1 Uređivanje i poravnavanje nukleotidnih sekvenci Sekvence preuzete od komercijalnog servisa provjerene su u programu BLAST (eng. Basic Local Alignment Tool) (Altschul et al. 1990), koji poredi dobijene sekvence sa već postojećim sekvencama za istraživanu vrstu u bazi NCBI (eng. National Center for Biotechnology Information). Pregledanje i sređivanje eksperimentalno dobijenih sekvenci pijavica vršeno je u programu Bioedit 7.2.4 (Hall 1999). Sređivanje poravnatih sekvenci podrazumijevalo je uklanjanje prajmera, loše očitanih početaka i/ili krajeva varijabilnih dužina. Razlike u očitanim nukleotidima provjerene su pregledanjem hromatograma pojedinačnih sekvenci. Sve eventualne greške u sekvencioniranju ručno su ispravljene, bilo da je u pitanju preklapanje signala ili izostavljanje neke od baza. 2.6.1.2 Filogenetičke i filogeografske analize Konačni set podataka za filogenetičke analiza pijavica obuhvatio je 52 sekvence, uključujući podatke iz ovog istraživanja i one dostupne u banci gena (GenBank). Program korišten za analizu poravnatih sekvenci i rekonstrukciju filogenetskih stabala je MEGA X softver, verzija 10.1.7 (Kumar et al. 2018). Analize su sprovedene filogenetskim metodama: najveće vjerovatnoće (



**ML; eng. maximum likelihood** ) i **susjednog sparivanja (NJ; eng. neighbour joining**

4

). Rekonstrukciji filogenetskog stabla prethodio je izbor optimalnog evolutivnog

**modela za svaki** genetički „ **biljeg** “. Evolutivni **ili nukleotidni** supstiticioni **modeli** **pretpostavljaju** na koji **je** način **došlo do nukleotidnih promjena u sekvencama** tokom evolutivne **prošlosti**

4

. Najpovoljniji evolutivni model odabran je pomoću Bajesijanske metode (BIC; eng. Bayesian information criterion). U sprovedenim filogenetičkim analizama (ML, NJ i BI), kao statistička podrška grananjima

**unutar stabla korištena je metoda bootstrap. Podrška za** grananje **unutar filogenetskih stabala** **određena je na** osnovu 500 **bootstrap ponavljanja za** ML **i** NJ **analizu**

4

. Parametri analiza za podatke

**postavljeni su na isti način. U NJ metodi korištene su** p- **distance, a u analizu su uključene tranzicije i** **transverzije. U**

4

analizi statističkom metodom ML korišteni su supstiticioni modeli TN93 + I +G) sa inicijalnim NJ modelom, a heuristička metoda odabira stabla je „Subtree-Pruning-Regrafting“ (SPR). Bajesijanski pristup rekonstrukcije (eng. Bayesian inference tree) izvršen je u programu MrBayes ver.

**3.2.2** (Huelsenback & **Ronquist, 2001, Ronquist et al. 2012** ) sa **106**

2

generacija. Filogenetska stabla uređena su u programu CoreIDRAW Graphics Suite X7 (<http://www.coreldraw.com>).

Nekorrigovane genetičke udaljenosti (PD; eng. p-distance) i korigovane genetičke udaljenosti (K2P; eng. Kimura two-parameter distance), unutar i između linija otkrivenih filogenetskim analizama, procijenjena je u programu MEGA. Sekvence roda Glossiphonia grupisane su u jedinstvene haplotipove pomoću softvera DnaSP version 6.0 (Rozas et al. 2017). U istom programu izračunati su i parametri genetičkog diverziteta iztraživanih populacija:

**diverzitet haplotipova (Hd), diverzitet nukleotida ( $\pi$ ), prosječan broj nukleotidnih razlika (k**

30

), varijabilna (polimorfna) mjesta (VPS), informativna mjesta za parsimoniju (PIS) (Tab.11). Mreža haplotipova konstruisana je u programu NETWORK 4.2.0.2 (Flexus Technologies Ltd. SAD), pomoću median joining algoritma (Bandelt, Forster & Röhl, 1999). Za prikazivanje rezultata mreže haplotipova, oslanjamo se na načela teorije slivanja ili srastanja (Freeland 2005, Templeton 1998), koji predviđaju: 1. Da su najfrekventniji haplotipovi, po pravilu najstariji. 2. U mreži haplotipova najstariji su unutrašnji haplotipovi, a mlađi haplotipovi raspoređuju se po rubu mreže. 3. Haplotipovi sa više međusobnih povezivanja po pravilu su stariji. 4. Stariji haplotipovi su geografski bolje rašireni, jer su za širenje imali više vremena. 5. Haplotipovi iste populacije po pravilu imaju samo jednu vezu, jer su se razvili kasnije i nijesu imali dovoljno vremena za širenje. 2.6.1.3 Razdvajanje vrsta U cilju genetičkog razdvajanja vrsta pijavica, korištena je ASAP analiza (eng.

**Assemble Species by Automatic Partitioning** ). Onlajn vezija (  
**<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html>**

33

) je primijenjena, a za udaljenost je izabran Kimura 2 parametar (K2P). Ova analiza bazira se na automatizovanoj metodi, pomoću koje se sekvence iz seta podataka razvrstavaju u hipotetičke vrste, odnosno molekularne operativne taksonomske jedinice (eng. Molecular Operational Taxonomic Units-- MOTUs). Što je niža vrijednost ASAP rezultata, to je uspješnije razdvajanje vrsta (Puillandre et al. 2021). Pored ASAP analize, u analizi pijavica korišten je mPTP pristup za razdvajanje vrsta, predložen od strane Kapli et al. (2017). Ova deliminaciona metoda bazira se na jednom lokusu. 2.6.1.4 Analize pomoću BOLD platforme BOLD platforma predstavlja web okruženje za korišćenje i analize DNK barkod sekvenci. U trenutku pisanja ove disertacije, navedena platforma sadržala je onlajn bazu DNK barkod sekvenci sa oko 330.244 zvanično opisanih vrsta životinja, biljaka, gljiva i protista (~13.8 miliona jedinki). Sekvence pijavica iz ove doktorske disertacije javno su dostupne u BOLD bazi, u kreiranom projektu „WBGLS“. Ovaj projekat sadrži podatke o analiziranim jedinkama (morfološka identifikacija, osoba koja je morfološki odredila jedinku, vrijeme i mjesto uzorkovanja, geografske koordinate itd.). Svim navedenim sekvencama dodijeljeni su BIN-ovi (eng. The Barcode Index Numbers), na osnovu algoritma koji obuhvata sve COI sekvence u BOLD bazi. Osim uloge svrstavanja barkod sekvenci do hipotetičkih vrsta, BIN-ovi imaju važnu ulogu u potvrđivanju unesenih podataka. Svaki BIN sadrži jedinstveni kod koji sadrži 3 slova praćena sa 4 broja (npr. BOLD: AAA1111). BOLD stvara odvojenu stranicu za svaki BIN, koji objedinjuje informacije o svojim članovima. Zbog značajne podudarnosti između BIN-ova i morfološki identifikovanih vrsta kod onih grupa organizama sa naprednijom taksonomijom, BIN-ovi pružaju dobre procjene vrsta. S obzirom da se algoritam koji dodjeljuje BIN-ove pokreće jednom mjesečno, oni se ne dodjeljuju odmah nakon unošenja sekvenci u BOLD platformu. 2.6.2 Bioinformatičke analize vodenih grinja 2.6.2.1 Uređivanje i poravnanje nukleotidnih sekvenci Sekvence vodenih grinja preuzete od MacroGen Inc. provjerene su u programu BLAST (eng. Basic Local Alignment Tool) (Altschul et al. 1990), koji poredi dobijene sekvence sa već postojećim sekvencama za istraživanu vrstu u bazi NCBI (eng. National Center for Biotechnology Information). Pregledanje i sređivanje eksperimentalno dobijenih sekvenci vodenih grinja vršeno je u programu Bioedit 7.2.4 (Hall 1999). Sređivanje poravnatih sekvenci podrazumijevalo je uklanjanje: prajmera, loše očitanih početaka i/ili krajeva

varijabilnih dužina. Razlike u očitanim nuleotidima provjerene su pregledanjem hromatograma pojedinačnih sekvenci. Sve greške u sekvencioniranju su ručno ispravljene, bilo da je u pitanju preklapanje signala ili izostavljanje neke od baza. Za jedinke vodenih grinja koje se analizirane u CCDB-u, pregledanje i sređivanje sekvenci i njihovo unošenje u BOLD bazu, dio je aktivnosti koje su sprovedene od strane osoblja ovog istraživačkog centra. 2.6.2.2 Filogenetičke i filogeografske analize Program korišten za analizu poravnatih sekvenci odabranog roda *Atractides* i rekonstrukciju filogenetskih stabala je MEGA X softver, verzija 10.1.7 (Kumar et al. 2018). Analize su sprovedene metodom susjednog sparivanja (NJ; eng. neighbour joining). Vrijeme divergencije vodenih grinja iz roda *Atractides* određeno je korištenjem programskog paketa BEAST ver. 1.7.4 (Drummond et al. 2012) na osnovu Bajesijanske evolutivne

**analize. Procjena vremena divergencije rađena je za COI set podataka**

4

sa intervalima 95 % pouzdanosti pod različitim evolutivnim modelima (Wilke et al. 2009). Korišten je evolutivni optimalni model i model relaksiranog molekularnog sata (eng. Uncorrelated lognormal relaxed molecular clock). Primijenjen je Yule proces specijacije (Gernhard, 2008). Analiza je sprovedena tokom 10 miliona

**generacija, a prvih 1000 (10 %) uzorkovanih stabala odbačeno je iz analize (burn-in). Pouzdanost analize provjerena je u programu Tracer ver. 1.5 (Rambaut & Drummond, 2009). Programom TreeAnnotator**

4

ver. 1.

**7.2 (Drummond et al. 2012 ) generisano je konsenzus filogenetsko stablo sa izračunatim vremenima divergencije**

4

. Dobijeno stablo je uređeno programom FigTree ver. 1.4.2 (Rambaut, 2012). Sekvence roda *Atractides* grupisane su u jedinstvene haplotipove pomoću softvera DnaSP verzija 6.0 (Rozas et al. 2017). U istom programu izračunati su i parametri genetičkog diverziteta istraživanih populacija:

**diverzitet haplotipova ( $H_d$ ), diverzitet nukleotida ( $\pi$ ), prosječan broj nukleotidnih razlika ( $k$ )**

30

), varijabilna (polimorfna) mjesta (VPS) i informativna mjesta za parsimoniju (PIS) (Tab.). Mreža haplotipova konstruisana je u programu NETWORK 4.2.0.2 (Flexus Technologies Ltd. SAD), pomoću median joining algoritma (Bandelt, Forster & Röhl, 1999). 2.6.2.3 Analize pomoću BOLD platforme U BOLD bazi kreirani su projekti sa DNK barkod sekvencama vodenih grinja

(morfološko određivanje, pol, osoba koja je morfološki odredila primjerak, vrijeme i mjesto sakupljanja, geografske koordinate itd.). Navedeni projekti mogu biti privatni – dostupni samo osobi koja ih je kreirala (i osobama koje ona odabere) ili javni – dostupni svim korisnicima. Sve DNK barkod sekvence vodenih grinja iz ove disertacije javno su dostupne u BOLD bazi, u okviru seta podataka „MNEHYD“ – DNK referentna biblioteka vodenih grinja Crne Gore (Slika 27). Uz pomoć analitičkog alata BOLD baze konstruisano je filogenetsko stablo svih DNK barkod sekvenci dobijenih ovim radom. Za rekonstrukciju filogenetskog stabla unutar BOLD baze korištena je opcija „Taxon ID tree“ metodom susjednog sparivanja (NJ; eng. neighbour joining). Sekvence su usklađene pomoću MUSCLE tip poravnavanja sekvenci (Edgar, 2004). Genetičke udaljenosti su izračunate pomoću udvojenih distanci (eng. Pairwise deletion), a uključene su sve pozicije kodona. Korišćene su samo pojedinačne DNK sekvence nastale ovim radom, pa stoga nijesu stvoreni jedinstveni haplotipovi. Alat „BOLD Identification Engine“ omogućio je upoređivanje dobijenih DNK barkod sekvenci vodenih grinja sa postojećim (javno i privatnim) u BOLD bazi. Rezultat je prikazan pomoću procenta sličnosti (npr. 100 % znači da je posmatrana DNK barkod sekvenca u potpunosti identična sa onom u bazi) (Prilog 2). U cilju procjene raznolikosti vodenih grinja u slivu Skadarskog jezera, korištena je i BOLD alat „Cluster Sequence“. Ona svrstava barkod sekvence u operativne taksonomske jedinice (eng. Operational Taxonomic Units – OTUs) (Ratnasingham & Hebert 2013). Pomoću ovog alata, nepoznate jedinice životinja razdvojene su u hipotetičke vrste, na osnovu definisanih morfoloških ili molekularnih udaljenosti (ili kombinacije navedenih udaljenosti). Razvrstavanje sekvenci u OTU, privremeno je i zasniva se isključivo na kreiranim projektima u BOLD platformi. To znači da, za razliku od BIN-ova, za koje BOLD platforma kreira trajne stranice, svrstavanje na OTU nije trajno. Slika 27. Prikaz seta podataka „DS – MNEHYD“ vodenih grinja u BOLD platformi. Svim sekvencama vodenih grinja dodijeljeni su BIN-ovi, prema algoritmu koji poredi sve COI sekvence u BOLD bazi. Izuzetak je samo jedna sekvenca *Hygrobatas longipalpis* dužine 201 bp, kojoj BIN nije dodijeljen.

### 3. REZULTATI 3.1.1 Rezultati morfološke analize pijavica

Prema morfološkoj analizi 33 jedinice pijavica porodice Glossiphoniidae, otkriveno je prisustvo tri roda: *Helobdella*, *Glossiphonia* i *Placobdella*. Rodovi *Helobdella* i *Placobdella* predstavljeni su sa po jednom vrstom (svaka sa po dvije jedinice) – *H. stagnalis* i *P. costata*. Najveći broj morfološki analiziranih vrsta pripada rodu *Glossiphonia*: *G. complanata*, *G. nebulosa*, *G. balcanica* i *G. concolor*. Kosmopolitska vrsta *G. complanata* dominira po broju analiziranih jedinki (Slika 28).

25 20 20 15 10 6 5 2 1 0 *G. complanata* *G. nebulosa* *G. balcanica* *G. concolor* Brojnost Slika 28. Rezultat morfološke analize 29 jedinki pijavica roda *Glossiphonia*. Osnovne morfološke karakteristike najvećeg broja vrsta roda *Glossiphonia* su: prisustvo šest očiju i istaknute papile na srednjem dijelu tijela (prstenu a2). Predstavnici roda *Placobdella* imaju dva para očiju, a *Helobdella* samo jedan par. Analizirane vrste pijavica iz roda *Glossiphonia* razlikuju se po sljedećim karakteristikama:

- *G. complanata* - istaknute papile samo na prstenu a2 središnjih somita; prisutna žuta bočna linija; tamne paramedijalne pruge uvijek isprekidane na prstenu a2, šest jasno odvojenih očiju
- *G. nebulosa* - papile su istaknute na a2 i a3 prstenu središnjih somita; izostanak žute bočne linije; tamne paramedijalne pruge uglavnom neprekinute; najčešće četvero spojenih očiju
- *G. balcanica* - paramedijalne pruge kontinuirane ili prekinute na prstenu a2; šest jasno odvojenih očiju
- *G. concolor* – dorzalna površina glatka, bez vidljivih papila; tamne paramedijalne pruge nepravilno isprekidane

Unutar vrste *G. complanata*, odvojene su jedinice koje pripadaju podvrstama *G. complanata complanata* i *G. complanata maculosa*. Jedinice iz Ohridskog i Prespanskog jezera identifikovane su kao *G. c. maculosa*. Riječ je o podvrsti koja je do sada zabilježena samo u Ohridskom jezeru. Od nominalne podvrste, *G. c. maculosa* morfološki se diferencira po izostanku jasno vidljivih papila, kao i braon pigmentaciji koja formira mrežaste šare po cijelom tijelu (Slika 29) (Sket 1968, Nesemann & Neubert, 1999). Jedinice vrsta *G. balcanica* i *G. nebulosa* liče jedna na drugu, ali se mogu razdvojiti na osnovu boje tijela. Kod *G. balcanica*, boja tijela je svijetlo braon, dok su

jedinke *G. nebulosa* sa Balkana, obojene sivo. Osim toga, razlika između ove dvije vrste ogleda se u medijalnom naboru na prednjoj pijavki. Ovaj nabor izostaje kod jedinki *G. balcanica*, a izražen je u populaciji *G. nebulosa* sa Kosova (mada je neznatno razvijen kod jedinke *G. nebulosa* sa locus *typicus*-a u Njemačkoj). Slika 29. Fotografije identifikovanih vrsta roda

**Glossiphonia A - *G. c. complanata*** , rijeka **Helme** (Njemačka), **B - *G. c. maculosa***

2

, Ohridsko jezero (Sjeverna Makedonija), C – *G. nebulosa*, rijeka Helme (Njemačka), D – *G. balcanica*, izvor Topla (

**Kosovo), E – *G. cf. nebulosa*** , izvor **Topla (Kosovo)** , (autori fotografija: **C. Grosser (A, D, E), V. Pešić (B), J. Händel (C)** ), preuzeto iz **Jovanović**

7

et al. 2021). 3.1.2 Rezultati molekularno-genetičkih analiza pijavica Ovim istraživanjem generisana su 33 DNK barkoda (COI sekvence) koje pripadaju porodici Glossiphoniidae, u punoj dužini od 658 baznih parova (Jovanović et al. 2021). Konačni set podataka koji je korišten za filogenetsku analizu, sa uvrštenim javno dostupnim sekvencama iz baze GenBank, sadržao je 52 sekvence. Opšta topologija “maximum likelihood” i “neighbour joining” filogenetskih stabala međusobno se podudarala (Slika 30). Iako je Bajesijanski pristup rekonstrukcije stabla (eng. Bayesian Inference), slabo podržan uz drugačiju topologiju, nekoliko klada bilo je u skladu sa rezultatima ML i NJ metoda (takođe prikazano na slici 30). Sve vrste roda *Glossiphonia* čine monofiletsku kladu, a *Helobdella* i *Placobdella*, koje su uključene kao outgrupe, predstavljaju odvojene sestrinske klade (podrška bootstrap ponavljanja > 96 %). I u ML i NJ filogenetskom stablu, COI sekvence roda *Glossiphonia* grupisane su u osam filogenetskih klada (Slika 30). Jedina vrsta koja naseljava sjeveroamerički kontinent, *G. elegans*, sestrinska je grupa kladi koja je sačinjena od svih analiziranih evropskih predstavnika ovog roda. Međutim, ova druga grupa podržana je sa malim brojem bootstrap ponavljanja (ML: 49 %). U BI analizi, ovaj odnos sestrinske grupe nije bio pronađen, a osim toga, odnosi među kladama slabo su podržani ovom filogenetskom metodom (Slika 30). Zbog toga, u daljem tekstu, za evropske predstavnike roda *Glossiphonia*, opisani su rezultati ML metode (Slika 30). Najveća klada, koja predstavlja vrstu *G. complanata*, podijeljena je na četiri subklade. Jedinke sakupljene u Ohridskom jezeru (u Albaniji i Sjevernoj Makedoniji) označene su kao *G. c. maculosa* (bootstrap podrška 97%). Zajedno sa *G. c. complanata* (MK479262), sakupljene u rijeci Gacka, Otočac, Hrvatska i *G. c. maculosa*, sakupljene u Prespanskom jezeru, Sjeverna Makedonija (LCHME024-20), čine subkladu 1 (Slika 30). Opisana subklada, sa izuzetkom jedinke iz Hrvatske, čini monofilum (iako sa slabom podrškom). Opseg vrijednosti K2P distance između *G. c. maculosa* iz Balkanskih jezera i *G. c. complanata* (sa izuzetkom jedinke MK479262 iz Hrvatske) iznosi  $2.07 \pm 0.5\%$ . Preostale (slabo do umjereno podržane) subklade predstavljene su geografski, do izvjesne granice. Subklada 2 (pretežno zapadna) sadrži jedinke sakupljene u Njemačkoj, Francuskoj i Ujedinjenom Kraljevstvu. Subklada 3 sačinjena je od jedinki sakupljenih u Austriji, Hrvatskoj i Sloveniji a subklada 4 sadrži jedinke sakupljene u Bosni i Hercegovini, Hrvatskoj i Crnoj Gori. *G. balcanica*, koja na filogenetskom stablu sadrži dvije jedinke sa Kosova, predstavlja sestrinsku kladu *G. complanata* kladi (uz visoku podršku bootstrap ponavljanja). Treća vrsta u ispitivanom setu podataka je *G. concolor*, a predstavljena je samo jednom jedinkom (LCHME041-20) iz Njemačke (Mecklenburg-Vorpommern). Ova sekvenca najbližnja je GenBank sekvenci *G.*

concolor iz Švedske. Sa druge strane, javno dostupna sekvenca iz Ukrajine (KM095097), značajno je udaljena, a na filogenetskom stablu čini klaster sa sekvencom *G. baicalensis* (AY047329) iz Bajkalskog jezera, Rusija. Još jednu udaljenu kladu formiraju dvije GenBank sekvence *Glossiphonia verrucata* iz Rusije. Četvrtoj vrsti koja je sekvencionirana u ovom radu, *G. nebulosa*, dodijeljene su dvije subklade. Prvu formira jedinka sa locus typicus-a u Njemačkoj (LCHME044-20), zajedno sa jedinkom iz Rusije (MN295412). Ova subklada predstavlja sestrinsku (sa visokom podrškom 99 %) preostaloj subkladi, koju čine *G. nebulosa* iz Bosne i Hercegovine i Kosova (u stablu označene kao *G. cf. nebulosa*). Osim navedenih jedinki, posljednja subklada sadrži sekvence koje pripadaju vrsti *G. verrucata*, a porijeklom su iz Hrvatske (MK479263-64) i Italije (AY96245). Zbog položaja sekvenci *G. verrucata* unutar klade *G. nebulosa*, posljednja vrsta postaje parafiletska (Slika 30). Vrste iz dva preostala roda, *Helobdella* i *Placobdella*, koje su analizirane u ovom radu kao outgrupe, formiraju odvojene klade uz visoku vrijednost bootstrap podrške (99 %). Dvije jedinke vrste *P. costata* identične su i posjeduju isti BOLD BIN (AEC5178). Nasuprot tome, dvije jedinke *H. stagnalis* predstavljene su različitim BIN-ovima u BOLD bazi, a vrijednost p - distance iznosi 4.1 %. Slika 30.

Filogenetsko stablo "najveće vjerovatnoće" (eng. maximum likelihood tree) porodice Glossiphoniidae, koje čine 52 COI sekvence. Vrijednosti bootstrap ponavljanja > 50 % date su na granama za obje filogenetske metode (ML/NJ). Osim toga, prikazane su BI vrijednosti vjerovatnoće ≥ 0.98 (treća vrijednost). Rezultati metoda za razdvajanje vrsta (ASAP i mPTP) date su u vertikalnim stupcima. Samo podebljane sekvence predstavljaju rezultat ove disertacije. Kodovi zemalja isti su kao u tabeli 5. Zvezdicom su označene jedinke sa tipskih lokaliteta (locus typicus) (preuzeto i modifikovano iz Jovanović et al. 2021). Tabela 9: Nazivi taksona, informacije o lokalitetima i BOLD / GenBank brojevi za jedinke pijavica korištene u filogenetskoj analizi. BOLD ID dati su za sekvence iz ove disertacije, dok je za sekvence iz prethodnih studija upisan GenBank ID. ID jedinke Lokalitet (Stanište, (haplotip) država) Koordinate

**BOLD / GenBank ID** Reference ***Glossiphonia verrucata* ROMIZ** Neimenovana rijeka, **I11753** 2

Hrvatska ( **CRO** ) **43.574722°N, 15.818889°E MK479263 Mack & Kvist (2019) ROMIZ** Neimenovana rijeka,

**I11755** Hrvatska ( **CRO** ) **43.574722°N, 15.818889°E MK479264 Mack & Kvist (2019)** rijeka Sade, Italija ( **IT** )

**AY962459 Siddall et al. (2005)** rijeka **Chechuy**, Rusija ( **RUS** ) **58.194640°N 109.294720°W MH670857**

**Kaygorodova et al. (2020)** jezero blizu **Meget**, Rusija ( **RUS** ) **52.451440°N, 104.027120°W MH670858**

**Kaygorodova et al. (2020) Glossiphonia complanata complanata BH1\_1** rijeka **Krupa**

blizu Vrbasa, Bosna i Hercegovina (

**BH** ) **44.616°N, 17.1495°E LCHME001-20** Ova disertacija **MN1\_1 Karuč, Podgorica**, Crna Gora ( **MN** ) 2

**42.3585°N, 19.1064°E LCHME008-20** Ova disertacija **MN1\_2 Karuč, Podgorica**, Crna Gora ( **MN** )

**42.3585°N, 19.1064°E LCHME009-20** Ova disertacija **MN2\_1** Rijeka **Crnojevića, Cetinje**, Crna Gora (

**MN** ) **42.3546°N, 19.0178°E LCHME010-20** Ova disertacija **MN5\_1 Vitoja**, (Tuzi) **Podgorica**, Crna Gora (

**MN** ) **42.3251°N, 19.3634°E LCHME013-20** Ova disertacija **MN6\_1** izvor **Dobro polje, Danilovgrad**, Crna

Gora ( **MN** ) **42.6305°N, 19.0324°E LCHME014-20** Ova disertacija **MN7\_1** izvor **Mareza, Podgorica**, Crna

Gora ( **MN** ) **42.48°N, 19.1822°E LCHME015-20** Ova disertacija **MN8\_1 Karuč, Podgorica**, Crna Gora ( **MN** )

**42.3585°N, 19.1064°E LCHME016-20** Ova disertacija **AUS\_Hir:2\_1 Kalte Wien** , Beč, Austrija ( **AUS**)  
**48.2934°N, 16.3915°E LCHME027-20** Ova disertacija **Gcomp1**

potok jezera Barschsee, Mecklenburg-Vorpommern, Njemačka, locus typicus (

**GER) 53.9147°N, 11.2815°E LCHME038-20** Ova disertacija **Gcomp2**

2

potok jezera Barschsee, Mecklenburg-Vorpommern, Njemačka, locus typicus (

**GER) 53.9147°N, 11.2815°E LCHME039-20** Ova disertacija **Gcomp3** mali potok blizu **Jesewitz** ,  
 Saksonija, Njemačka ( **GER) 51.3812°N, 12.6733°E LCHME040-20**

2

Ova disertacija Rijeka Duro, Francuska (

**FR) MF458715 Corse et al. (2017** ) Evropa ( **EU) AF003277** Sidall & **Burreson (1998) Creek,**  
**Mecklenburg- Vorpommern** , distrikt **Nordwestmecklenburg** , Njemačka ( **GER) 53.81848°N,**  
**10.92799° E HM246608** Trajanovsky **et al. (2010** ) Ujedinjeno Kraljevstvo ( **UK) AY047321 Light & Siddall**  
**(1999) ROMIZ** I11749 rijeka **Korana**

2

, Hrvatska (

**CRO) 45.117222°N, 15.592778°E MK479279 Mack & Kvist (2019) ROMIZ I11748** rijeka **Korana** ,  
 Hrvatska ( **CRO) 45.117222°N, 15.592778°E MK479278 Mack & Kvist (2019) ROMIZ I11717** rijeka **Sava**  
 , Slovenija ( **SLO) 46.084444°N, 14.587222°E MK479277 Mack & Kvist (2019) ROMIZ I11743** rijeka **Gacka** ,  
 Hrvatska ( **CRO) 44.851667°N, 15.233611°E MK479262 Mack & Kvist (2019) Glossiphonia complanata maculosa**  
**MAC1\_1** Sv. **Naum**

2

, izvor Crnog Drima, Ohridsko jezero, Sjeverna Makedonija (MAC) – locus typicus

**40.9138°N, 20.7433°E LCHME020-20** Ova disertacija **MAC2\_1 Lagadin**

2

, Ohridsko jezero, Sjeverna Makedonija (

**MAC) 41.0422°N, 20.8039°E LCHME021-20** Ova disertacija **MAC2\_2 Lagadin**

2

, Ohridsko jezero, Sjeverna Makedonija (

**MAC) 41.0422°N, 20.8039°E LCHME022-20** Ova disertacija **MAC3\_1 Peštani**

2

, Ohridsko jezero, Sjeverna Makedonija (

**MAC) 41.0095°N, 20.8059°E LCHME023-20** Ova disertacija **MAC4\_1 Oteševo**

2

, Prespansko jezero, Sjeverna Makedonija (

**MAC) 40.9919°N, 20.9322°E LCHME024-20** Ova disertacija **ALB1a\_d Pogradec** , Ohridsko jezero, Albanija ( **ALB) 40.9058°N, 20.6556°E LCHME029-20** Ova disertacija **ALB1a\_1 Pogradec** , Ohridsko jezero, Albanija ( **ALB) 40.9058°N, 20.6556°E LCHME030-20** Ova disertacija **ALB3b\_2 Tushemisht** , Ohridsko jezero, Albanija ( **ALB) 40.9035°N, 20.7172°E LCHME035-20** Ova disertacija **Glossiphonia concolor Gconc1 Krakower Obersee, Mecklenburg-Vorpommern** , Njemačka ( **GER) 53.6074°N, 12.2976°E LCHME041-20** Ova disertacija rijeka **Kila** , Švedska ( **SWE) AY962458 Siddall et al. (2005** ) Ukrajina ( **UKR) KM095097 Kaygorodova & Mandzyak (2014) Glossiphonia balcanica Gbalc1** izvor **Toplla, Dečani, Kosovo (KOS)** ) - locus typicus **42.57194° N, 20.29056°E LCHME036-20** Ova disertacija **Gbalc2** izvor **Toplla, Dečani, Kosovo (KOS)** ) - locus typicus **42.57194° N, 20.29056°E LCHME037-20** Ova disertacija **Glossiphonia nebulosa Gnebu4** potok **Berliner Chaussee Nieplitz, Berlin** , Njemačka - locus typicus **52.1348°N, 12.9449°E LCHME044-20** Ova disertacija **Yamalo-Nenets Autonomous Okrug** , Rusija ( **RUS) MN295412 Bolotov et al. (2019) KOS1\_1** izvor **KS 40** , Peć, **Kosovo (KOS) 42.6283°N, 20.246°E LCHME004-20** Ova disertacija **KOS1\_2** izvor **KS 40** , Peć, **Kosovo (KOS) 42.6283°N, 20.246°E LCHME005-20** Ova disertacija **BH3\_1 Banja Luka**

2

, blizu kaštela, Bosna i Hercegovina (



**BH) 44.7657°N, 17.193°E LCHME002-20** Ova disertacija **Gnebu1** izvor **Topla, Dečani, Kosovo (KOS)** 2  
**42.57194° N, 20.29056°E LCHME042-20** Ova disertacija **Gnebu3** izvor **Topla, Dečani, Kosovo (KOS)**  
**42.57194° N, 20.29056°E LCHME043-20** Ova disertacija **Glossiphonia elegans ROMIZ** nepoznata lokva,  
 Nopiming, **I11505 Manitoba**, Kanada ( **CAN) 50.452222°N, 95.5125°W MK479253 Mack & Kvist (2019)** )  
 jezero **Bemidji**, država **Beltrami**, Minesota, (SAD) **JQ073869 Moser et al. (2012) Glossiphonia**  
**baicalensis** Bajkalsko jezero, Rusija ( **RUS) AY047329 Light & Siddall (1999)** ) "Outgrupe" **Placobdella**  
**costata MN4\_1** izvor **Oraška jama, Danilovgrad**, Crna Gora ( **MN) 42.5309°N, 19.0921°E LCHME012-20**  
 Ova disertacija **MN9\_1** izvor **Crno oko, Podgorica**, Crna Gora ( **MN) 42.4844°N, 19.1542°E LCHME017-20**  
 Ova disertacija **Helobdella stagnalis BH3\_2** blizu kaštela, **Banja Luka**, Bosna i Hercegovina ( **BH)**  
**44.7657°N, 17.193°E LCHME003-20** Ova disertacija **MAC4\_2 Oteševo**

, Prespansko jezero, Sjeverna Makedonija (MAC) 40.9919°N, 20.9322°E LCHME025-20 Ova disertacija 3.1.3 Genetičke distance i razdvajanje vrsta pijavica Srednje vrijednosti interspecifičnih K2P genetičkih distanci, između morfološki diferenciranih vrsta *Glossiphonia*, iznosile su između 3.17 i 12.69 % (Tabela 10). Minimalna vrijednost K2P od  $3.17 \pm 0.6$  % nađena je između klada, *G. balcanica* sa Kosova i *G. complanata*. Maksimalna vrijednost od  $12.69 \pm 1.6$  % je između klada *G. cf. nebulosa* i sibirske *G. verrucata*. Srednja vrijednost od  $5.07 \pm 0.8$  % razdvaja kladu *G. nebulosa* koja sadrži jednu sekvencu iz Njemačke i jednu iz Rusije, od klade koja sadrži jedinke sa područja Balkana (uključujući jedinke privremeno označene kao *G. cf. nebulosa*). Najveća vrijednost srednje intraspecifične distance zabilježena je unutar

**G. complanata (1.64** %; maks. **3** %) i **G. cf. nebulosa (1.31** %; maks. **4**

2

%). Srednja vrijednost intraspecifične distance unutar klade, u tabeli označene kao *G. nebulosa*, iznosila je 0.9 % (Tabela 10). U ASAP metodu uključene su skoro sve sekvence, izuzev *G. verrucata* iz Italije (AY962459), koja je isključena zbog prisustva dvosmislenih (eng. ambiguous) nukleotida (detaljno opisano u Kaygorodova et al. 2020). Procijenjena „barkod praznina“ za analizirani set podataka procijenjen je na 4-8 %. Ovom metodom identificovano je 7 MOTU (hipotetičkih vrsta) pri distanci 5.46 % (K2P) (sa boljim ASAP rezultatom 3.50): *G. complanata* (zajedno sa

**G. balcanica), G. concolor, G. concolor** iz Ukrajine, **G. baicalensis, G. elegans, G. nebulosa** i **G.**  
**verrucata**

2

. Pri graničnoj vrijednosti od 3.59 % (K2P) (ali sa slabijim ASAP rezultatom 9.50), ovom analizom pronađena je još jedna vrsta *Glossiphonia* sa Balkana (označena *G. cf. nebulosa*), koja morfološki podsjeća na *G. nebulosa*. Konačno, mPTP analiza grupisala je *Glossiphonia* sekvence u šest većih vrsta, spojivši *G. complanata* i *G. balcanica*. Nasuprot ASAP rezultatima, ovom

metodom, visoko divergentne linije *G. baicalensis* i *G. concolor* grupisane su u jednu vrstu (Slika 30). Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (...) i Hydrachnidia (...) na području sliva Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022. Tabela 10: Interspecifične srednje vrijednosti K2P distance analiziranih vrsta pijavica (Glossiphoniidae) (ispod dijagonale) i p-distance (iznad dijagonale) sa vrijednostima standardne devijacije. U dijagonalama su date vrijednosti intraspecifičnih divergenci (srednje vrijednosti u zagradama; vrijednosti K2P i p-distance približno su iste). Broj jedinki koji je razmatran za svaku kladu prikazan je u zagradi. U kladi *G. cf. nebulosa* (n = 8), uključene su tri sekvence vrste *G. verrucata* iz Italije i Hrvatske. Filogenetske klade 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 1 *G. complanata* (n=28) 0-3.0 (1.64) 3.08±0.61 8.29±1.1 7.29±1.0 7.20±1.0 9.42±1.2 9.75±1.2 9.93±1.2 10.29±1.2 19.31±1.6 16.03±1.5 2 *G. balcanica* (n=2) 3.17±0.6 0 (0) 8.35±1.2 5.88±1.0 6.26±1.0 9.30±1.2 9.49±1.2 9.84±1.2 9.68±1.2 18.79±1.6 15.56±1.5 3 *G. verrucata* RUS (n=2) 8.80±1.3 8.86±1.3 0 (0) 9.30±1.2 10.25±1.3 10.82±1.3 11.01±1.3 11.62±1.3 11.20±1.2 21.35±1.7 17.46±1.6 4 *G. concolor* UKR (n=1) 7.68±1.1 6.13±1.1 9.94±1.4 (n/c) 5.88±1.0 8.35±1.2 8.92±1.2 9.30±1.3 9.96±1.3 20.30±1.7 17.08±1.6 5 *G. baicalensis* (n=1) 7.59±1.2 6.55±1.2 11.05±1.5 6.14±1.1 (n/c) 9.01±1.2 8.54±1.2 9.23±1.3 10.15±1.3 19.83±1.7 16.13±1.5 6 *G. concolor* GER, SWE (n=2) 10.12±1.4 9.98±1.4 11.73±1.6 8.94±1.4 9.68±1.4 0-0.3 (0.3) 9.68±1.2 8.61±1.3 11.29±1.3 21.63±1.7 17.46±1.6 7 *G. nebulosa* (n=2) 10.47±1.4 10.17±1.4 11.95±1.6 9.54±1.4 9.14±1.4 10.43±1.4 0-0.9 (0.9) 4.89±1.3 11.10±1.3 22.49±1.8 17.17±1.5 8 *G. cf. nebulosa* (n=8) 10.72±1.4 10.63±1.4 12.69±1.6 10.04±1.4 9.92±1.4 9.19±1.3 5.07±0.8 0-4.0 (1.31) 10.82±1.3 22.30±1.8 17.10±1.6 9 *G. elegans* (n=2) 11.11±1.5 10.40±1.5 12.14±1.6 10.76±1.5 10.95±1.5 12.29±1.7 12.05±1.6 11.76±1.5 0-0.3 (0.19) 20.49±1.7 16.98±1.5 10 *Helobdella stagnalis* (n=2) 18.07±2.1 17.46±2.2 19.90±2.4 19.42±2.4 18.16±2.3 19.90±2.5 19.53±2.6 19.47±2.5 19.32±2.4 0-4.1 (4.1) 20.21±1.7 11 *Placobdella costata* (n=2) 22.41±2.0 21.67±2.0 25.28±2.1 23.72±2.1 23.05±2.1 25.63±2.2 26.84±2.1 26.58±2.1 24.02±2.1 23.63±2.4 0 (0) 70|str. 3.1.4 Genetička varijabilnost sekvenci pijavica Osnovni parametri genetičkog diverziteta analiziranih vrsta pijavica dati su u tabeli 11. Pomoću softvera DnaSP ver. 6.0 detektovano je 36 različitih haplotipova u analiziranom setu podataka (Tabela 11 i 12). Tabela 11: Osnovni parametri genetičkog diverziteta populacija pijavica *Glossiphonia* N (broj uzoraka) Nh (broj različitih haplotipova)

**Hd (diverzitet haplotipova) π (diverzitet nukleotida) k** (prosječan broj nukleotidnih razlika

12

) VPS (varijabilna polimorfna mjesta) PIS (informativna mjesta za parsimoniju) 50 36 0.98 0.079 44.235 208 185 U analizu su uvrštene skoro sve sekvence roda *Glossiphonia*, izuzev *G. verrucata* iz Italije (AY962459) i *G. concolor* iz Švedske (AY962458), koje nijesu prihvaćene zbog prethodno navedenih razloga (prisustvo dvosmislenih nukleotida). Diverzitet COI haplotipova iznosio je Hd = 0.98. U okviru COI sekvenci bilo je 208 polimorfnih mjesta, od kojih je 185 parsimonijski informativno. Mreža haplotipova (eng. median joining network), pokazuje jasno odvajanje između haplotipova (Slika 32). Haplotipovi sa najvećom frekvencijom su: Hap\_19, Hap\_20 i Hap\_25, koji nose po 9 % analiziranih jedinki. Haplotip Hap\_11 nosi 6.5 % analiziranih jedinki pijavica (tri jedinke *G. complanata* sa područja Njemačke), a haplotipovi Hap\_22, Hap\_32 i Hap\_35 nose po 4.5 % jedinki (dvije jedinke *Placobdella costata* iz Crne Gore, *G. balcanica* sa Kosova i *G. verrucata* iz Sibira) (Slika 31). Sve preostale haplotipove nosi po jedna jedinka. Saglasno dosadašnjim rezultatima, najveći broj haplotipova pripada jedinkama *G. complanata*. Jedinke nominalne podvrste *G. c. complanata* nose 15 različitih haplotipova, dok jedinke *G. c. maculosa* nose 5 različitih haplotipova (Tabela 11 i 12). Hap\_19 Hap\_20 Hap\_25 Hap\_11 Hap\_22 Hap\_32 Hap\_35 4.5% 4.5% 9.0% 4.5% 9.0% 6.5% 9.0% Slika 31.

Procentualna zastupljenost haplotipova koje su najfrekventniji među analiziranim jedinkama pijavica. Dvije jedinke *G. balcanica* sa istog lokaliteta na Kosovu nose zajednički haplotip Hap\_32. Dvije analizirane jedinke *G. concolor*, prva sa locus *typicus-a* u Njemačkoj i druga iz Ukrajine, nose dva različita haplotipa (Hap\_34 i Hap\_4). Jedina analizirana jedinka *G. baicalensis* iz Rusije, nosi haplotip Hap\_5. Dvije jedinke *G. verrucata* iz Rusije nose zajednički haplotip Hap\_35, dok dvije jedinke iz Hrvatske nose različite haplotipove Hap\_14 i Hap\_15. Analizirane jedinke vrste *G. nebulosa* nose 4 različita haplotipa. Prvoj grupi, koju čine jedinka sa locus *typicus-a* iz Njemačke i jedinka iz Rusije, dodijeljena su dva različita haplotipa (Hap\_36 i Hap\_16). Jedinke koje pripadaju subkladi označenoj kao *G. cf. nebulosa*, nose dva različita haplotipa. Sve analizirane jedinke *G. nebulosa* sa Kosova nose zajednički haplotip Hap\_19, dok jedinka iz Bosne i Hercegovine nosi haplotip Hap\_2. Dvije jedinke vrste *G. elegans*, sakupljene u Kanadi i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), nose odvojene haplotipove (Hap\_17 i Hap\_18). I u ovoj analizi, kao outgrupe, uključene su sekvence rodova *Helobdella* i *Placobdella*. Jedinke vrsta *Helobdella stagnalis* nose dva različita haplotipa (Hap\_3 i Hap\_29). Njih, kao i Hap\_22, koji nose dvije jedinke *Placobdella costata*, od svih preostalih haplotipova odvaja veliki broj mutacionih koraka. Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta *Glossiphoniidae* (...) i *Hydrachnidia* (...) na području sliva Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022. Slika 32. Mreža haplotipova (eng. median joining network) konstruisana u programu NETWORK ver. 4.2.0.1 sa 50 COI sekvenci pijavica porodice *Glossiphoniidae*. Veličina krugova proporcionalna je frekvenciji predstavljenog haplotipa. Oznake haplotipova koje nose jedinke date su u Tabeli 11. 73|str. Tabela 12: Haplotipovi za COI sekvence analiziranih pijavica

Broj	Vrsta	Haplotip
1	<i>G. c. complanata</i>	BH Hap_1 BH1_1
2	<i>G. cf. nebulosa</i>	BH Hap_2 BH3_1
3	<i>H. stagnalis</i>	BH Hap_3 BH3_2
4	<i>G. concolor</i>	UKR Hap_4 KM095097
5	<i>G. baicalensis</i>	RUS Hap_5 AY047329
6	<i>G. c. complanata</i>	CRO Hap_6 MK479279
7	<i>G. c. complanata</i>	CRO Hap_7 MK479278
8	<i>G. c. complanata</i>	SLO Hap_8 MK479277
9	<i>G. c. complanata</i>	CRO Hap_9 MK479262
10	<i>G. c. complanata</i>	EU Hap_10 AF003277
11	<i>G. c. complanata</i>	GER Hap_11 HM246608
Gcomp1		
Gcomp2		
12	<i>G. c. complanata</i>	FR Hap_12 MF458715
13	<i>G. c. complanata</i>	UK Hap_13 AY047321
14	<i>G. verrucata</i>	CRO Hap_14 MK479263
15	<i>G. verrucata</i>	CRO Hap_15 MK479264
16	<i>G. nebulosa</i>	RUS Hap_16 MN295412
17	<i>G. elegans</i>	CAN Hap_17 MK479253
18	<i>G. elegans</i>	USA Hap_18 JQ073869
19	<i>G. cf. nebulosa</i>	KOS Hap_19 KOS1_1 KOS1_2 Gnebu1 Gnebu3
20	<i>G. c. complanata</i>	MN Hap_20 MN1_1 MN1_2 MN6_1 MN8_1
21	<i>G. c. complanata</i>	MN Hap_21 MN2_1
22	<i>P. costata</i>	MN Hap_22 MN4_1 MN9_1
23	<i>G. c. complanata</i>	MN Hap_23 MN5_1
24	<i>G. c. complanata</i>	MN Hap_24 MN7_1
25	<i>G. c. maculosa</i>	MAC/ALB Hap_25 MAC1_1 MAC2_2 Alb1a_1 Alb3b_2
26	<i>G. c. maculosa</i>	MAC Hap_26 MAC2_1
27	<i>G. c. maculosa</i>	MAC Hap_27 MAC3_1
28	<i>G. c. maculosa</i>	MAC Hap_28 MAC4_1
29	<i>H. stagnalis</i>	MAC Hap_29 MAC4_2
30	<i>G. c. complanata</i>	AUS Hap_30 AUS2_1
31	<i>G. c. maculosa</i>	ALB Hap_31 ALB1a_d
32	<i>G. balcanica</i>	KOS Hap_32 Gbalc1 Gbalc2
33	<i>G. c. complanata</i>	GER Hap_33 Gcomp3
34	<i>G. concolor</i>	GER Hap_34 Gconcl
35	<i>G. verrucata</i>	RUS Hap_35 MH670857 MH670858
36	<i>G. nebulosa</i>	GER Hap_36 Gnebu4

Za konstrukciju mreže haplotipova, koja je prikazana na slici 33, uključili smo isključivo haplotipove vrste *G. complanata*. Ovom analizom, haplotipovi *G. complanata* raspoređeni su u četiri veće grupe, koje odgovaraju subkladama 1, 2, 3 i 4 u filogenetskoj analizi (Slika 30). Iz tog razloga, grupe u mreži haplotipova, imenovane su na sličan način kao i pomenute subklade (Slika 30 i 33). Na osnovu analize COI gena, kao spoljne grupe u mreži haplotipova prikazane su pijavice iz Sjeverne Makedonije i Albanije, koje odgovaraju podvrsti *G. c. maculosa* (grupa 1). Izvorno mjesto širenja nominalne podvrste *G. c. complanata*, prema ovoj analizi, je u Crnoj Gori, (uz haplotipove iz Bosne i Hercegovine i Hrvatske) (grupa 4), odakle bi se pijavice širile prema Hrvatskoj, Sloveniji i Austriji (grupa 3), odnosno Njemačkoj i zapadnoj Evropi (grupa 2). Slika 33. Mreža haplotipova (eng. median joining network) četiri grupe subklada *G. complanata* na osnovu 28 analiziranih COI sekvenci. Veličina krugova proporcionalna je frekvenciji

predstavljenog haplotipa. Oznake haplotipova koje nose jedinke date su u Tabeli 12. Rezultati mrežne analize haplotipova G. complanata ne poklapaju se sa načelima teorije slivanja ili srastanja. Uzrok za odstupanja od prvog načela je različit broj uzoraka sa lokaliteta na kojima su sakupljene pijavice. Rezultati su pokazali da su skoro svi haplotipovi terminalni, a da je malo unutrašnjih (pređačkih). Haplotipovi koji su grupisani na krajevima dugih grana, ukazuju da je riječ o populacijama koje su se dugo vremena razvijale nezavisno. Tabela 13: Haplotipovi za COI sekvence analiziranih jedinki G. complanata

Broj Vrsta	Haplotip	Sekvence
1	G. c. complanata BH	Hap_1 BH1_1
2	G. c. complanata CRO	Hap_2 MK479279
3	G. c. complanata CRO	Hap_3 MK479278
4	G. c. complanata SLO	Hap_4 MK479277
5	G. c. complanata CRO	Hap_5 MK479262
6	G. c. complanata EU	Hap_6 AF003277
7	G. c. complanata GER	Hap_7 HM246608
		Gcomp1 Gcomp2
8	G. c. complanata SLO	Hap_8 MF458715
9	G. c. complanata FR	Hap_9 AY047321
10	G. c. complanata MN	Hap_10 MN1_1 MN1_2 MN6_1 MN8_1
11	G. c. complanata MN	Hap_11 MN2_1
12	G. c. complanata MN	Hap_12 MN5_1
13	G. c. complanata MN	Hap_13 MN7_1
14	G. c. maculosa MAC/ALB	Hap_14 MAC1_1 MAC2_2 Alb1a_1 Alb3b_2
15	G. c. maculosa MAC	Hap_15 MAC2_1
16	G. c. maculosa MAC	Hap_16 MAC3_1
17	G. c. maculosa MAC	Hap_17 MAC4_1
18	G. c. complanata AUS	Hap_18 AUS2_1
19	G. c. maculosa MAC	Hap_19 ALB1a_d
20	G. c. complanata GER	Hap_20 Gcomp3

3.2.1 Rezultati morfoloških analiza i DNK barkod identifikacije vodenih grinja Sa područja sliva Skadarskog jezera uspješno je dobijen DNK barkod od 109 jedinki vodenih grinja, sa dužinom od 201 do 658 baznih parova. Navedene jedinke čine 53 operativne taksonomske jedinice - OTU, odnosno 55 BIN-ova, u koje ih je razdvojila BOLD platforma. Prema integrativnoj metodi, koja uključuje morfološku analizu i DNK barkod identifikaciju, registrovane su 52 vrste vodenih grinja. Prvo su sve jedinke morfološki određene, a zatim su rezultati upoređeni sa rezultatima prema BOLD bazi. Kod jedinki kod kojih se nije podudarala morfološka analiza sa rezultatima molekularno-genetičkih analiza, provjereno je da li je došlo do greške pri morfološkoj analizi ili u BOLD bazi. Jedinke koje nijesu mogle biti morfološki određene do nivoa vrste (npr. morfološki određena do nivoa roda Piona, a u BOLD bazi određena kao Piona laminata), određene su metodom DNK barkodiranja i pod tim imenom navedeni u BOLD bazi (Prilog 2). Na istraživanom području, u slivu Skadarskog jezera, identifikovano je 16 porodica vodenih grinja. Najveći broj vrsta pripada porodicama Hygobatidae i Lebertidae (po 28 i 21 COI sekvenci). Sa druge strane, veći broj porodica predstavljen je sa samo jednom vrstom, poput: Athienemanniidae, Hydrodromiidae, Hydryphantidae, Limnesiidae, Limnochariidae, Oxidae, Teutoniidae i Wettinidae (Slika 37, 1. 2. 3. i 4. dio). Najdominatniji rodovi su: Lebertia sa devet vrsta, Atractides sa osam vrsta i Torrenticola sa četiri vrste. Dvanaest rodova je predstavljeno sa samo jednom vrstom. Najveći broj barkodova po vrsti, zabilježen je kod Lebertia inaequalis i Atractides pennatus (po sedam), a zatim Mideopsis roztoczensis (pet) i Piona damkoehleri (četiri). Najveći broj vrsta prisutan je sa samo jednom sekvencom, što je onemogućilo procjenu intraspecifične distance. Sve dobijene sekvence dio su DNK referentne biblioteke barkodova vodenih grinja Crne Gore, a skoro polovina cjelokupnog broja jedinki sakupljena je na području sliva Skadarskog jezera (47 %). Javno dostupna biblioteka DNK barkodova vodenih grinja Crne Gore ("MNEHYD") sadrži 232 DNK barkodova, što odgovara broju od 86 morfološki identifikovanih vrsta i 100 BIN-ova (Pešić et al. 2021a). To predstavlja 43 % cjelokupne faune vodenih grinja Crne Gore (Prilog 2). Sve novo dobijene sekvence javno su dostupne u banci gena (GenBank) pod kodovima OL870072 – OL870304. Srednja vrijednost K2P intrageneričke distance (unutar rodova) iznosi  $20.2 \pm 0.0$  % [opseg 6.09 – 42.37]. Srednja vrijednost K2P intraspecifične distance je  $2.43 \pm 0.01$  % [opseg 0 – 24.16]. Ukupna statistika koja pokazuje značajne varijacije prosječne vrijednosti K2P distance u okviru različitih taksonomskih nivoa data je u tabeli 14. Tabela 14. Vrijednosti K2P genetičke distance unutar različitih taksonomskih nivoa, procijenjene na osnovu analize 232 sekvence vodenih grinja sa područja Crne Gore. Lista svih vrsta data je u Prilogu 2. Oznaka n Takson Poređenja

<b>Min Dist</b>	(%) Sred	<b>Dist (%) Max Dist (%) SE Dist</b>	(%) Unutar vrsta	<b>200 53 391 0.00 2.43 24.16 0.01</b>	3
Unutar rodova	<b>207 14 2291 6.09 20.20 42.37 0.00</b>	Unutar porodica	<b>168 7 1054 16.17 37.14 63.16 0.01</b>		

3.2.2 Nove vrste vodenih grinja u fauni Crne Gore i Balkanskog poluostrva U slivnom području Skadarskog jezera barkodirane su 52 vrste vodenih grinja. Od ovog broja, u prethodnim studijama u fauni Crne Gore evidentirano je 47 vrsta. Zahvaljujući kombinovanoj metodi morfolološke analize i DNK barkoding identifikacije, otkrivene su tri nove vrste za faunu Crne Gore sa područja sliva Skadarskog jezera. Pored toga, sa istog područja nađene su dvije nove vrste za faunu vodenih grinja Balkanskog poluostrva.

3.2.2.1 Nova vrsta za Crnu Goru iz roda *Lebertia* Ovim istraživanjem potvrđen je nalaz vrste *Lebertia reticulata* Koenike, 1919, koja do sada nije zabilježena u Crnoj Gori. Morfološki opis: Membranozni integument sa nepravilnim prugama, koje u centru dorzuma formiraju mrežasti (retikularni) oblik. U donjem sloju integumenta smještene su grupe sitnih pora, koje odgovaraju mrežastom obrascu. Ova vrsta ima vinsko-crvenu boju, sa ljubičastim ili plavim, sklerotizovanim djelovima (Slika 34). Od vrste *L. rufipes*, koja joj je morfološki najbližnja, odvajaju je: šare na integumentu, postojanje dvije dorzalne sete na četvrtom segmentu nogu (IV-L-1) i nešto manje dimenzije palpi i nožnih segmenata. Na filogenetskom stablu (slika 37, 2. dio), *L. reticulata* predstavlja spoljašnju liniju klasteru koju čine vrste *L. natans* i *L. porosa*. Distribucija ove vrste ograničena je na centralnu i jugoistočnu Evropu. Naseljava limnokrena staništa (hladna planinska jezera). Na istraživanom području, jedinka ove vrste nađena je u izvoru Vukovo vrelo, na teritoriji opštine Nikšić. Osim navedenog nalaza, u DNK referentnoj bazi podataka vodenih grinja Crne Gore, uspješno su dobijena dva DNK barkoda vrste *L. reticulata* sa lokaliteta Bukovica, iz sjevernog dijela Crne Gore. Slika 34. (lijevo) Jedinka *Lebertia reticulata* sa lokaliteta izvor Vukovo vrelo, novi nalaz za Crnu Goru. Slika 35. (desno) Jedinka vrste *Unionicola ypsilophora* sa lokaliteta Rijeka Crnojevića, novi nalaz za Balkansko poluostrvo (fotografije: Vladimir Pešić).

3.2.2.2 Nova vrsta za Crnu Goru iz roda *Atractides* Ovim istraživanjem po prvi put zabilježen je nalaz vrste *Atractides latipes* (Szalay, 1935) u fauni vodenih grinja Crne Gore. Morfološki opis: Prugasti integument, umeci mišića nesklerotizovani. Genitalno područje sa acetabulumom u blago zakrivljenoj liniji. Ekskretorna pora sklerotizovana. Prva ventralna glandularija (vg-1) spojena je sa drugom (vg-2). Ženke su nešto većih dimenzija od mužjaka. Vrsta *A. giustinii* Gerecke & Di Sabatino, 2013 sa Korzike i Sardinije, posjeduje slične dimenzije idiozome, ali se razlikuje po dimenzijama nožnih segmenata i palpi. Vrsta *A. gorgani* Pešić et al. 2009 iz Irana, ima slične morfološke karaktere, ali se razlikuje po nesklerotizovanoj ekskretornoj pori i užim segmentima palpi. Filogenetsko stablo konstruisano metodom susjednog sparivanja grupiše *A. latipes* sa vrstom *A. inflatipes* (slika 37, 1. dio). Vrsta *A. latipes* naseljava istočnu, južnu i centralnu Evropu. U slivu Skadarskog jezera pronađena je na lokalitetu - rijeka Cijevna (opština Tuzi). Riječ je o vrsti koja je ritrobiont i preferira hiporeična staništa.

3.2.2.3 Nova vrste za Crnu Goru iz roda *Parabrachypoda* *Parabrachypoda montii* (Maglio, 1924) nova je vrsta u fauni vodenih grinja Crne Gore. Morfološki opis: Idiozoma je kod oba pola izduženo-ovalna; boja tijela žućkasto-smeđa. Ženke imaju veće dimenzije od mužjaka. Dorzalni štitić je u prednjem dijelu tijela odvojen od ventralnog štitića. Mužjaci: dužina/širina idiozome 485-530/377-410 µm; dužina/širina dorzalnog štitića 470/350 µm, ekskretorna pora blizu posljednje margine. Dužina segmenata palpi:

**P-1: 35; P-2: 56; P-3: 32; P-4: 103; P-5: 32 µm**

18

. Ženke: dužina/širina idiozome 570-620/412-460  $\mu\text{m}$ ; dužina/širina dorzalnog štita 560-580/410-430  $\mu\text{m}$ , ekskretorna pora spojena sa dorzalnim štitom. Dužina segmenata palpi:

**P-1: 35-37; P-2: 58-63; P-3: 32-33; P-4: 100-102; P-5: 29-33  $\mu\text{m}$**

18

. Na filogenetskom stablu, jedina sekvenca vrste *P. montii* grupisana je sa sekvencom vrste *Wettina lacustris*. U BOLD bazi, na osnovu rezultata alata "BOLD Identification Engine", najveća podudarnost ove vrste iznosi 80.98 %, sa sekvencama *Hydryphantes* sp. (Prilog 2). Ovo je vodena grinja koja naseljava stajaće vode i stajaće djelove potoka. Njena distribucija ograničena je na centralnu i istočnu Evropu. U slivu Skadarskog jezera, nađena je u kanalu rijeke Mareze, jednoj od pritoka Morače. 3.2.2.4 Nova vrsta za Balkansko poluostrvo iz roda *Piona* Ovim istraživanjem potvrđen je prvi nalaz vrste *Piona laminata* (Thor, 1901) za Balkansko poluostrvo. Tipična je prolječna vrsta koja naseljava privremene stajaće vode. Nađena je na lokalitetu Moromiš, u privremenoj stajaćoj bari. Morfološki opis: Crveno obojena vrsta. Idiozoma anteriorno skraćena. Mužjaci se teško razdvajaju od mužjaka vrste *P. nodata*. Ženke su veće od mužjaka. Dužina idiozome kod ženki: 1200-1800  $\mu\text{m}$ . Na filogenetskom stablu, vrsta *P. laminata* predstavlja sestrinsku vrstu kladi koju čine vrste *P. damkoehleri* i *P. disparilis*. U BOLD bazi, najveća podudarnost jedine sekvence *P. laminata* zabilježena je sa sekvencom *P. nodata* (87.18 %) (Prilog 2). U pitanju je vrsta koja je rasprostranjena u cijelom Palearktiku. Zbog nejasnog taksonomskog statusa unutar grupe *Piona nodata*, nejasni su dosadašnji nalazi ove vrste. Molekularni podaci odvajaju ovu vrstu od *P. nodata*, mada ukazuju na to da se sastoji od dvije vrste: populacije iz Norveške razlikuje se od populacija u ostalim djelovima Evrope. Jedna od njih predstavlja vrstu nezavisnu vrstu *P. inflata*. 3.2.2.5 Nova vrsta za Balkansko poluostrvo iz roda *Unionicola* Ženka vrste *Unionicola ypsilophora* (Bonz, 1783) nađena je u škržnim filamentima školjke *Anodonta exulcerata* Porro, 1838. Morfološki opis: Idiozoma je izduženog ovalnog oblika. Integument je izbočen, povremeno granulozan. Noge imaju nekoliko, prilično kratkih seta. Terminalni segmenti formiraju izdignute kandže (Slika 35). Genitalno područje smješteno je na zadnjem kraju tijela, sa 15-25 parova acetabula. Mužjaci: dužina/širina idiozome 1120-1300/420-900  $\mu\text{m}$ ; dorzum često sa ovalnim štitom; dužina segmenata P-4: 155-196; P-5: 82-94  $\mu\text{m}$ . Ženke: dužina/širina idiozome 885-1950/495-1350  $\mu\text{m}$ ; dorzum često sa dvije izdužene ploče. Dva para velikih, okruglih genitalnih ploča, svaka ima po tri duge sete. Dužina segmenata P-4: 151-183; P-5: 91-105  $\mu\text{m}$ . Na filogenetskom stablu, jedina sekvenca *U. ypsilophora* grupiše se sa sekvencom *Neumania imitata*, iz zajedničke porodice *Unionicolidae*. U BOLD bazi, zabilježena je najveća podudarnost sa istoimenom sekvencom *U. ypsilophora* 95.87 % (Prilog 2). U pitanju je vrsta koja naseljava stajaće i sporotekuće vode. Rasprostranjena je na tlu Evrope, a njeni nalazi potvrđeni su i u Kini i Japanu. U postlarvalnom stadijumu parazitira u škržnim filamentima školjki roda *Anodonta*, a pokazuje visoku preferenciju prema vrsti *A. cygnea* L. 1758. 3.2.3 Distribucija vodenih grinja u slivu Skadarskog jezera Od ukupno 53 vrste vodenih grinja, koje su prema Zawal & Pešić (2018), registrovane u Skadarskom jezeru i okolnim vodenim tijelima, našim rezultatima potvrđeni su nalazi 16 vrsta (Tabela 11). Ovaj rezultat opravdan je veoma malim brojem uzoraka sa astatične površine Skadarskog jezera. Naime, u ovom radu, najveći broj uzoraka sakupljen je u okolnim kraškim izvorima i rijekama (Slika 17, Tabela 8), za razliku od istraživanja pomenutih autora. Uzimajući u obzir navedeno, 79 % sakupljenih vodenih grinja predstavlja faunu koja je karakteristična za lotička staništa (Slika 36). Jedina vrsta koja je endem Skadarskog jezera, *Trichothyas jadranae*, pronađena je i u ovom istraživanju na locus typicus-u (izvor u Poseljanima). S obzirom da riječ o rijetkoj vrsti, ovaj nalaz značajan je za

verifikaciju ovog endema na tipskom lokalitetu. Istovremeno, to je jedina vrsta koja pripada porodici Hydryphantidae. U riječnim tokovima dominiraju ritrobionti, vrste koje ne mogu da žive izvan lotičkih staništa. Karakteristični predstavnici koji predstavljaju ovu faunu pripadaju porodicama Hydryphantidae, Lebertidae, Hygrobatidae, Torrenticolidae, Sperchontidae i Aturidae. Jedinu rod porodice Lebertidae, *Lebertia*, jedan je od najbrojnijih, sa devet vrsta u slivu Skadarskog jezera. Unutar porodice Hygrobatidae, dominiraju rodovi *Atractides* sa osam vrsta i *Hygrobates* sa tri vrste. Porodica Torrenticolidae sadrži vrstama bogat rod *Torrenticola* (sa četiri vrste), *Pseudotorrenticola* i *Monatractides* sa po jednom vrstom. Kod porodice Sperchontidae, izdvajaju se dva roda: *Sperchon* (sa tri vrste u slivu Skadarskog jezera) i *Sperchonopsis* (jedina vrsta *S. verrucosa*). Porodica Aturidae, osim poznate vrste *Hexaxonopsis serrata*, sadrži i vrstu *Parabanchypoda montii*, koja je nova vrsta u fauni Crne Gore.

Povremeno, neke vrste koje se javljaju u lentičkim staništima, sakupljene su u lotičkim staništima, naselivši područja duž obala sa smanjenim protokom vode. Takve su vrste *Neumania imitata* i *Mundamella germanica*. Sliv Skadarskog jezera odlikuje se velikim brojem izvora, koji sadrže raznolike i vrlo često brojne zajednice vodenih grinja. Najveći broj izvora je reokrenog tipa, a limnokreni izvori dominiraju u nizijama. Helokreni i reohelokreni tipovi izvora na ovom području su manje zastupljeni. Najbrojnija vrsta u reokrenim izvorima u ovom istraživanju je *Atractides pennatus*. Od 12 prethodno opisanih krenobionata u slivu Skadarskog jezera (Zawal & Pešić, 2018), ovim radom potvrđeni su nalazi vrsta: *Trichothyas jadranae*, *Atractides fonticulus* i *A. pennatus* (Tabela 15). Jedan broj preostalih krenobionata: *Protzia squamosa paucipora*, *Lebertia schechteli* i *Hygrobates norvegicus*, zabilježene su na drugim lokalitetima u Crnoj Gori, u izvorima van ovog slivnog područja (Prilog 3). Raznovrsnost vodenih grinja u temporalnim vodama u slivu Skadarskog jezera istražena je na pojedinim lokalitetima (npr. bara Moromiš u dolini rijeke Zete). U ovim staništima dominiraju zajednice vodenih grinja, čiji životni ciklus traje dok takva staništa ne presuše. Takve su vrste *Piona disparilis*, *P. damkoehleri*, *P. laminata*, *Typhis ornatus*, *T. torris* i *Arrenurus refractariolus*. U ovoj disertaciji, raznovrsnost vodenih grinja u intersticijalnim vodama u slivu Skadarskog jezera, slabo je ispitana. Jedinu lokalitet u Crnoj Gori, na kome je uspješno sakupljen materijal vodenih grinja je potok Bukovica (Kolašin) (Slika 36). Na drugim lokalitetima, uzorkovanjem u intersticijalnim staništima nijesu nađene vodene grinje. Distribucija vodenih grinja po staništima 4% 1% 16% lotička lentička 79% temporalna intersticijalna Slika 36. Distribucija vodenih grinja u Crnoj Gori, dobijena na osnovu analize 232 jedinke.

### 3.2.4 Filogenetski odnosi vodenih grinja u slivu Skadarskog jezera na osnovu DNK barkodinga Metodom susjednog sparivanja (NJ) na osnovu COI mitohondrijskog gena, konstruisano je filogenetsko stablo vodenih grinja sa područja sliva Skadarskog jezera (Slika 37. 1. dio, 2. dio 3. dio i 4. dio). Filogenetski odnosi rekonstruisani su korištenjem alata BOLD platforme (Taxon ID tree). Za cjelokupni set podataka, od 232 sekvence vodenih grinja iz Crne Gore, filogenetsko stablo prikazano je u Prilogu 4. Dobijeni rezultati saglasni su sa važećom taksonomijom vodenih grinja. Unutar porodice Hygrobatidae, rodovi *Atractides* i *Hygrobates* razdvajaju se u dvije odvojene linije (Slika 37. 1. dio). Rod *Atractides* pojavljuje se monofiletski, a u okviru ovog roda odvajaju se četiri subklade (slika 37. 1. dio). Prvu subkladu čine jedinke vrsta *A. nodipalpis* i *A. robustus*. Ona se postavlja kao spoljna preostalim subkladama. Subklada 2, koju čine *A. inflatipes* i *A. latipes* (obje sa po jednom jedinkom), sestrinska je trećoj i četvrtoj. Treću subkladu čine jedinke vrste *A. stankovici*. Četvrtu čine sekvence vrsta *A. fluviatilis*, *A. fonticulus* i *A. pennatus*. Vrsta *A. fluviatilis*, predstavljena jednom jedinkom, postavlja se kao sestrinska vrstama u posljednjoj subkladi. Rod *Hygrobates* je monofiletski (slika 37. 1. dio). U okviru ovog roda izdvajaju se tri subklade. Subkladu 1 čine sve sekvence vrste *H. longipalpis*. Unutar ove subklade, odvajaju se sekvence SEPTA028-21, koja je ranije pomenuta zbog izrazito male dužine (201 bp) i nedodjeljivanja BIN-a. Subkladu 2 čini samo jedna jedinka vrste *H. limnocrenicus*. Dvije sekvence vrste *H. calliger* čine treću odvojenu subkladu. Porodica Hydryphantidae postavljena je odvojeno, sa samo jednom

sekvencom *Trichothyas jadrankae* (Slika 37. 1. dio). Porodica *Limnocharidae* na stablu je postavljena kao spoljna linija sa samo jednom sekvencom u ovoj studiji, *Limnochaeres aquatica* (Slika 37. 1. dio). Porodica *Lebertidae* nije monofiletska, pošto se rod *Lebertia* grupiše sa nominalnim rodom porodice *Torrenticolidae* (*Torrenticola*) (Slika 37. 2. dio). Preciznije, vrsta *L. insignis* grupiše se sa vrstom *T. amplexa*. Ova klada postavljena je kao spoljna preostaloj kladi, koje čine vrste iz roda *Lebertia*. U ovoj kladi izdvajaju se dvije subklade. Prvu čine sekvence vrsta *L. porosa*, *L. natans* i sestrinske vrste *L. reticulata*. Drugu čine sekvence vrsta *L. variolata*, *L. maglioi* (na stablu označena kao *Lebertia* sp.) i sestrinske *L. maculosa*. Posljednja vrsta unutar pomenute subklade, *L. inaequalis*, odvaja se kao spoljna linija (Slika 37. 2. dio). Porodice *Sperchontidae* i *Torrenticolidae* takođe nijesu monofiletske (Slika 37. 2. i 3. dio). Vrsta *Sperchonopsis verrucosa* (porodica *Sperchontidae*) grupiše se sa vrstom *Sperchon hispidus* (prva subklada). Sestrinsku subkladu čine jedina sekvenca vrste *Sperchon clupei* i sekvence vrste *Hexaxonopsis serrata* (porodica *Aturidae*). Sve preostale vrste porodice *Torrenticolidae*, izuzev prethodno pomenute *Torrenticola amplexa* (slika 37. 2 dio), čine jedan klaster. U okviru njega, odvajaju se dvije subklade. Prvu čine: jedina vrsta roda *Pseudotorrenticola* - *P. rhynchota* (koja je postavljena kao spoljna linija) subklade koju čine vrste *T. meridionalis* i *T. laskai* i sestrinska vrsta iz roda *Monatractides* (*M. madritensis*). Drugu subkladu čine: *Torrenticola brevirostris* i jedina sekvenca vrste *Lebertia cuneifera*. Vrsta *Sperchon thienemanni* čini odvojenu liniju, koja je predstavljena kao spoljna raznovrsnom klasteru koju čine vrste iz porodica *Hydrodromidae*, *Mideopsidae*, *Athienemannidae* i *Arrenuridae*. U okviru ove grupe mogu se izdvojiti tri odvojene linije (Slika 37. 3. dio). Prvu odvojenu liniju čine jedina vrsta iz porodica *Hydrodromidae* - *Hydrodroma reinhardi*. Drugu odvojenu liniju čini jedina vrsta porodice *Mideopsidae* - *Mideopsis roztoczensis*. Treću liniju čini jedina vrsta porodice *Athienemannidae* - *Mundamella germanica*. Ona se postavlja kao sestrinska porodici *Arrenuridae*, koja je monofiletska. Ova porodica sadrži dvije linije koje pripadaju rodu *Arrenurus* - *A. refractarioulus* i *A. cylindricus* (slika 37. 3. dio). U ovom filogenetskom stablu, porodice *Oxidae* i *Limnesiidae*, sa po jednom vrstom predstavljene su kao sestrinske. *Oxus angustipositus* i *Limnesia undulata*, jedine su vrste u vodenih grinja iz ovih porodica u slivu Skadarskog jezera. Porodica *Pionidae* je monofiletska, odvajajući se u dvije genetske linije roda *Tiphys* i *Piona*. Rod *Tiphys* sadrži dvije sestrinske vrste *T. torris* i *T. ornatus*. Rod *Piona* odvaja se u tri podgrupe, koje predstavljaju vrste saglasno onome kako su morfološki određene: *P. damkoehleri*, *P. disparilis* i *P. laminata*. Porodica *Unionicolidae* razdvaja se u dvije linije. Vrsta *Neumania limosa* je sestrinska vrstama iz porodice *Pionidae*. Preostale vrste iz porodice *Unionicolidae*: *Neumania imitata*, *Unicola minor* i *Unicola ypsilophora*, grupišu se sa vrstama porodica *Aturidae* i *Wettinidae*. Naime, ove tri vrste predstavljaju odvojene linije u subkladi koju osim njih, čine predstavnici porodica *Aturidae* i *Wettinidae*. Jedina vrsta iz porodice *Aturidae* - *Parabrachypoda monti*, grupiše se sa jedinom vrstom iz porodice *Wettinidae*, *Wettina lacustris*. Porodica *Teutonidae* odvaja se od svih navedenih porodica sa samo jednom vrstom *Teutonia cometes* (Slika 37. 4. dio). Slika 37. 1 dio Filogenetsko stablo vodenih grinja u slivu Skadarskog jezera, konstruisano metodom susjednog sparivanja na osnovu mitohondrijskog COI gena. Porodice vodenih grinja predstavljene su različitim bojama. Svaka od 109 jedinki sadrži ID iz BOLD baze, naziv porodice, naziv vrste i BIN. BIN-ovi su upisani za sve jedinke, za koje su bili dostupni do 20. februara, kada je vršena barkod analiza. Slika 37. 2 dio Filogenetsko stablo vodenih grinja u slivu Skadarskog jezera, konstruisano metodom susjednog sparivanja na osnovu mitohondrijskog COI gena. Porodice vodenih grinja predstavljene su različitim bojama. Svaka od 109 jedinki sadrži ID iz BOLD baze, naziv porodice, naziv vrste i BIN. BIN-ovi su upisani za sve jedinke, za koje su bili dostupni do 20. februara, kada je vršena barkod analiza. Slika 37. 3 dio Filogenetsko stablo vodenih grinja u slivu Skadarskog jezera, konstruisano metodom susjednog sparivanja na osnovu mitohondrijskog COI gena. Porodice vodenih grinja predstavljene su različitim bojama. Svaka od 109 jedinki sadrži ID iz BOLD



baze, naziv porodice, naziv vrste i BIN. BIN-ovi su upisani za sve jedinke, za koje su bili dostupni do 20. februara, kada je vršena barkod analiza. Slika 37. 4 dio Filogenetsko stablo vodenih grinja u slivu Skadarskog jezera, konstruisano metodom susjednog sparivanja na osnovu mitohondrijskog COI gena. Porodice vodenih grinja predstavljene su različitim bojama. Svaka od 109 jedinki sadrži ID iz BOLD baze, naziv porodice, naziv vrste i BIN. BIN-ovi su upisani za sve jedinke, za koje su bili dostupni do 20. februara, kada je vršena barkod analiza. Tabela 15: Nazivi taksona, informacije o lokalitetima i BOLD / GenBank brojevi za 109 jedinki vodenih grinja korištene u filogenetskoj analizi. Za svaku jedinku upisani su BIN brojevi, koji su im dodijeljeni u BOLD bazi podataka. Zvezdicom (\*) su označene vrste koje se navode u radu Zawal & Pešić (2018). Broj Naziv taksona ID jedinke Lokalitet (grad, tačna lokacija) Koordinate BOLD/ GenBank ID BIN (Barcode Index Number) Limnocharidae 1 Limnochares aquatica 31. CG2020\_6\_C10 Podgorica, rijeka Zeta, Pričelje 42.5022N, 19.2225E DNAEC032- 20/OL870272 BOLD:ACS0438 Hydriphantidae 2 Trichothyas jadranae \* CCDB-3867-A08 Bar, Poseljani, Poseljski potok 42.3095N, 19.0557E DNCBD008- 20/OL870193 BOLD:AEF1286 Hydrodromidae 3 Hydrodroma reinhardi CCDB-3867-G04 Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša 42.4057N, 19.3569E DNCBD076- 20/OL870294 BOLD:AEF0798 Lebertiidae Thor, 1900 4 5 CCDB-3867-G08 Lebertia maglioi (Lebertia sp. 2MC) CCDB-3867-F10 Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša Danilovgrad izvor ispod gradskog mosta 42.4057N, 19.3569E 42.5542N, 19.1059E DNCBD080- 20/OL870270 DNCBD070- 20/OL870167 BOLD:ADK0383 6 Lebertia cuneifera CCDB-38363 A01 Nikšić, planina Lukavica, izvor Babino Sicelo 42.8043N, 19.2152E SEPTA001- 21/OL870208 BOLD:ADV4392 7 CCDB-3867-B05 Lebertia variolata Bar, potok u selu Godinje 42.2206N, 19.1118E DNCBD017- 20/OL870247 Broj Naziv taksona ID jedinke Lokalitet (grad, tačna lokacija) Koordinate BOLD/ GenBank ID BIN (Barcode Index Number) 8 CCDB-3867-B07 Bar, potok u selu Godinje 42.2206N, 19.1118E DNCBD019- 20/OL870093 BOLD:ADK0996 9 CCDB38233 F03 Danilovgrad izvor ispod gradskog mosta 42.5541N, 19.1057E DCCDB063- 21/OL870091 10 Lebertia natans CCDB38233 F04 Danilovgrad izvor ispod gradskog mosta 42.5541N, 19.1057E DCCDB064- 21/OL870275 BOLD:AEF5684 11 CCDB-3867-F06 Danilovgrad izvor ispod gradskog mosta 42.5542N, 19.1059E DNCBD066- 20/OL870162 12 CCDB-3867-C03 Tuzi, Vitoja, bazen 42.324N, 19.3637E DNCBD027- 20/OL870246 BOLD:AEF5913 13 14 15 Lebertia inaequalis \* CCDB-3867-B11 CCDB-3867-C02 CCDB 38363 B04 Tuzi, Vitoja, bazen Tuzi, Vitoja, bazen Bar, Skadarsko jezero, Murići 42.324N, 19.3637E 42.324N, 19.3637E 42.1637N, 19.2214E DNCBD023- 20/OL870155 DNCBD026- 20/OL870146 SEPTA016- 21/OL870271 BOLD:ADF6223 16 CCDB 38363 B06 Bar, Skadarsko jezero, Murići 42.1637N, 19.2214E SEPTA018- 21/OL870282 17 CCDB 38363 B10 Podgorica, Skadarsko jezero, Donja Plavnica 42.2724N, 19.2007E SEPTA022- 21/OL870220 Broj Naziv taksona ID jedinke Lokalitet (grad, tačna lokacija) Koordinate BOLD/ GenBank ID BIN (Barcode Index Number) 18 CCDB 38363 B11 Podgorica, Gornja Plavnica 42.2889N, 19.2108E SEPTA023- 21/OL870177 19 Lebertia insignis CCDB-38233 B12 Danilovgrad, rijeka Zeta, Slap 42.6001N, 19.0656E DCCDB024- 21/OL870127 BOLD:AEB9107 20 Lebertia maculosa CCDB 38361 HO1 Kolašin, izvor kod manastira Morača 42.7668N, 19.3906E DCDDJ085- 21/OL870181 BOLD:AED9718 21 CCDB-3867-G09 Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša 42.4057N, 19.3569E DNCBD081- 20/OL870224 BOLD:ACS0974 22 Lebertia porosa \*

**CCDB-38363 C10 Cetinje** , Rijeka **Crnojevića 42.3557N, 19.0228E** SEPTA034- **21**

1

/OL870153 23 CCDB-38233 A01 Podgorica, izvor Mareza 42.4801N, 19.1822E DCCDB001- 21/OL870200 24 7. CG2020\_10 Tuzi, Vitoja izvor 42.3254N, 19.3628E DNAEC006- 20/OL870262 BOLD:AED4662 25 Lebertia reticulata

**CCDB 38363 A11 Nikšić** , izvor **Vukovo vrelo 42.8574N, 18.9426E**

1

SEPTA011- 21/OL870303 BOLD:ADV4392 Oxidae 26 Oxus angustipositus CCDB-38679- A11 Cetinje, Poseljanski izvor, niži dio 42.3057N, 19.0557E DNCBD011- 20/OL870215 BOLD:AEB9099 27 \* CCDB 38363 B05 Bar, Skadarsko jezero, Murići 42.1637N, 19.2214E SEPTA017- 21/OL870142 28 CCDB 38363 B07 Bar, Skadarsko 42.1637N, 19.2214E SEPTA019- 21/OL870215 Broj Naziv taksona ID jedinice Lokalitet (grad, tačna lokacija) Koordinate BOLD/ GenBank ID BIN (Barcode Index Number) jezero, Murići Teutoniidae Koenike, 1910 29 30 Teutonia cometes \* 33. M19\_20\_3\_F11 Hyd\_MN\_VP5 Podgorica, Mreža kanal Danilovgrad, izvor Svinjiška vrela 42.479N, 19.1813E 42.6384N, 19.0074E DNAEC068- 20/OL870142 DNAEC079- 20/OL870180 BOLD:ACH7884 Sperchontidae 31 Sperchon clupeiifer \* CCDB-3867-B04 Bar, potok u selu Godinje 42.2206N, 19.1118E DNCBD016- 20/OL870218 BOLD:ACS1100 32 33 Sperchon hispidus 12. M19 29A 8\_E3 29. CG2020\_7\_C8C7 Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž 42.5113N, 19.1982E 42.5113N, 19.1982E DNAEC050- 20/OL870144 DNAEC030- 20/OL870170 BOLD:AED3202 34 CCDB 38363 A02 Nikšić, planina Lukavica, izvor Babino Sicelo 42.8043N, 19.2152E SEPTA002- 21/OL870228 35 Sperchon thienemanni CCDB 38363 A04 Nikšić, planina Lukavica, izvor Babino Sicelo 42.8043N, 19.2152E SEPTA004- 21/OL870149 BOLD:ADV4077 36 CCDB 38363 A05 Nikšić, planina Lukavica, izvor Babino Sicelo 42.8043N, 19.2152E SEPTA005- 21/OL87092 Broj Naziv taksona ID jedinice Lokalitet (grad, tačna lokacija) Koordinate BOLD/ GenBank ID BIN (Barcode Index Number) 37 Sperchonopsis verrucosa CCDB 38361 B11 Cetinje, izvor "Smokov vijenac" 42.254N, 18.9902E DCDDJ023- 21/ OL870266 BOLD:AEK8297 Torrenticolidae 38 Monatractides madritensis CCDB-3867-G11 Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša 42.4057N, 19.3569E DNCBD083- 20/ OL870125 BOLD:AED3803 39 CCDB-3867-B01 Bar, potok u selu Godinje 42.2206N, 19.1118E DNCBD013- 20/ OL870106 BOLD:AEL3852 40 CCDB-3867-F08 Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta 42.5542N, 19.1059E DNCBD068- 20/ OL870086 41 Torrenticola amplexa \* CCDB-3867-F09 Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta 42.5542N, 19.1059E DNCBD069- 20/ OL870109 BOLD:ACR0665 42 CCDB38233 G04 Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta 42.5542N, 19.1059E DCCDB076- 21/ OL870281 43 Torrenticola 42. M19\_29A\_5\_G6 Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž 42.5113N, 19.1982E DNAEC073- 20/ OL87095 44 brevirostris

**CCDB 38363 C12 Podgorica, Morača, Podgorica 42.4368N, 19.2559E**

1

SEPTA036- 21/ OL870263 BOLD:AED9586 45 Torrenticola laskai CCDB-3867-G06 Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša 42.4057N, 19.3569E DNCBD078- 20/ OL870197 BOLD:AEF5471 Broj Naziv taksona ID jedinice Lokalitet (grad, tačna lokacija) Koordinate BOLD/ GenBank ID BIN (Barcode Index Number) 46 Torrenticola CCDB-3867-G02 Bar, rijeka Orahovštica 42.2476N, 19.0798E DNCBD074- 20/ OL870233 47 meridionalis CCDB-3867-G01 Bar, rijeka Orahovštica 42.2476N, 19.0798E DNCBD073- 20/ OL870095 BOLD:AED7519 48 49 Pseudotorrenticola rhynchota CCDB-3867-B02 CCDB-3867-B03 Bar, potok u selu Godinje Bar, potok u selu Godinje 42.2206N, 19.1118E 42.2206N, 19.1118E DNCBD014- 20/ OL870108 DNCBD015- 20/ OL870102 BOLD:AEF1632 Limnesiidae 50 51 Limnesia undulata \* CCDB-3867-C05 CCDB-38363- C03 Tuzi, Vitoja, bazen Tuzi, Skadarsko jezero, Podhum 42.324N, 19.3637E 42.3139N, 19.3534E DNCBD029- 20/ OL870238 SEPTA027- 21/ OL870238 BOLD:AAX5286 Hygrobatidae 52 Atractides fluviatilis CCDB-3867-G10 Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša 42.4057N, 19.3569E DNCBD082-

20/OL870238 BOLD:AEF1143 53 *Atractides inflatipes* CCDB-3867-G03 Bar, Orahovštica potok 42.2476N, 19.0798E DNCBD075-  
 20/OL870205 BOLD:AEF1144 54 *Atractides fonticolus* CCDB38233 B09 Podgorica, Pričelje, izvor Studenac 42.4835N, 19.2429E  
 DCCDB021- 21/OL870291 BOLD:AEI8720 55 CCDB38233 B08 Podgorica, Pričelje, 42.4835N, 19.2429E DCCDB020-  
 21/OL870079 Broj Naziv taksona ID jedinke Lokalitet (grad, tačna lokacija) Koordinate BOLD/ GenBank ID BIN (Barcode Index  
 Number) spring Studenac 56 CCDB-3867-F07 Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta 42.5542N, 19.1059E DNCBD067-  
 20/OL870084 BOLD:ACR0209 58 CCDB-3867-F05 Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta 42.5542N, 19.1059E DNCBD065-  
 20/OL870165 BOLD:AED3547 57 *Atractides nodipalpis* \*

**41. M19\_29A\_1\_G5 Danilovgrad** , rijeka **Zeta, Spuž 42.5113N, 19.1982E**

3

DNAEC072- 20/OL870210 59

**40. M19\_29A\_1\_G4 Danilovgrad** , rijeka **Zeta, Spuž 42.5113N, 19.1982E**

3

DNAEC071- 20/OL870145 60 61 CCDB-3867-F11 CCDB-38679- A09 Bar, rijeka Orahovštica

**Bar, Poseljani, Poseljski** potok **42.2476N, 19.0798E 42.3057N, 19.0557E**

3

DNCBD071- 20/OL870283 DNCBD009- 20/OL870150 62 63 64 *Atractides pennatus* 25. CG2020\_9\_C6 23. CG2020\_9\_C5 32.  
 M19\_23\_1\_F10 Podgorica, Mareza izvor Podgorica, Mareza izvor Nikšić, Vidrovan, Vukovo vrelo, izvor 42.4801N, 19.1821E  
 42.4801N, 19.1821E 42.8575N, 18.9414E DNAEC028- 20/OL870135 DNAEC027- 20/OL870285 DNAEC067- 20/OL870230  
 BOLD:ADF7007 65

**31. M19\_23\_1\_F9 Nikšić, Vidrovan, Vukovo vrelo** , izvor **42.8575N, 18.9414E**

5

DNAEC066- 20/OL870126 Broj Naziv taksona ID jedinke Lokalitet (grad, tačna lokacija) Koordinate BOLD/ GenBank ID BIN  
 (Barcode Index Number) 66 4. M19\_22\_1 D8 Nikšić, izvor u selu Miločani 42.8265N, 18.9018E DNAEC042- 20/OL870206 67  
*Atractides robustus* CCDB 38361 H02 Kolašin, izvor manastir Morača 42.7668N, 19.3906E DCDDJ086- 21/OL870295  
 BOLD:ADZ9348 68 *Atractides latipes* 18. M19\_08B\_7\_E9 Podgorica, rijeka Cijevna, Trgaja 42.3964N, 19.3798E DNAEC056-  
 20/OL870105 BOLD:AED4000 69 CCDB38233 C08 Danilovgrad, rijeka Zeta, Slap 42.6001N, 19.0656E DCCDB032- 21/OL870245  
 70 *Atractides* CCDB38233 C07 Danilovgrad, rijeka Zeta, Slap 42.6001N, 19.0656E DCCDB031- 21/OL870189 BOLD:AED3550 71  
 stankovici

**13. CG2020\_4 B10 Podgorica, Mareza** kanal **42.479N, 19.1813E**

3

DNAEC020- 20/OL870242 72

**14. CG2020\_4 B11 Podgorica, Mareza** kanal **42.479N, 19.1813E**

3

DNAEC021- 20/OL870231 73 Hygrobatas calliger CCDB-38679- A04 Bar, Poseljani, Poseljanski izvor 42.3095N, 19.0518E  
 DNCBD004- 20/OL870089 BOLD:AEF4261 74 CCDB-38679- A03 Bar, Poseljani, Poseljanski izvor 42.3095N, 19.0518E  
 DNCBD003- 20/OL870083 75 Hygrobatas limnocrenicus 13. M19\_20\_5\_E4 Podgorica, Mareza kanal 42.479N, 19.1813E  
 DNAEC051- 20/OL870173 BOLD:AED2489 Broj Naziv taksona ID jedinke Lokalitet (grad, tačna lokacija) Koordinate BOLD/  
 GenBank ID BIN (Barcode Index Number) 76 77 78 Hygrobatas longipalpis \* CCDB-3867-C07 CCDB-3867-C09 CCDB-38679-  
 A10 Tuzi, Vitoja, bazen Tuzi, Vitoja, bazen Bar, Poseljani, Poseljanski izvor 42.324N, 19.3637E 42.324N, 19.3637E 42.3057N,  
 19.0518E DNCBD031- 20/OL870073 DNCBD033- 20/OL870265 DNCBD010- 20/OL870190 BOLD:ACR9783 79 CCDB 38363 C04  
 Tuzi, Skadarsko jezero, Podhum 42.3139N, 19.3534E SEPTA028- 21/OL870297 N/N Unionicolidae 80 Neumania imitata 15.  
 M19\_29C\_2\_E6 Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž 42.5113N, 19.1982E DNAEC053- 20/OL870108 BOLD:AED4073 81 82 83  
 Neumania limosa \* CCDB-3867-C10 CCDB-3867-C01 CCDB38233 G06 Tuzi, Vitoja, bazen Tuzi, Vitoja, bazen Tuzi, Vitoja, bazen  
 42.324N, 19.3637E 42.324N, 19.3637E 42.324N, 19.3637E DNCBD034- 20/OL870251 DNCBD025- 20/OL870088 DCCDB078-  
 21/OL870187 BOLD:AEF5902 84 Unionicola minor \* CCDB 38363 B09 Tuzi, Vitoja, bazen 42.324N, 19.3637E SEPTA021- 21/  
 OL870255 BOLD:AEF4865 85

**Unionicola ypsilophora CCDB 38363 D04 Cetinje** , Rijeka Crnojevića ( **Anodonta exulcerata**) **42.3546N, 19.0286E**

3

SEPTA040- 21/OL870236 BOLD:AEN6889 86 Piona damkoeherli CCDB 38361 B03 Danilovgrad, bara Moromiš 42.5322N,  
 19.1993E DCDDJ015- 21/OL870134 BOLD:AEK5107 Broj Naziv taksona ID jedinke Lokalitet (grad, tačna lokacija) Koordinate  
 BOLD/ GenBank ID BIN (Barcode Index Number) 87 CCDB B04 38361 Danilovgrad, bara Moromiš 42.5322N, 19.1993E  
 DCDDJ016- 21/OL870124 88 CCDB B05 38361 Danilovgrad, bara Moromiš 42.5322N, 19.1993E DCDDJ017- 21/OL870288 89  
 CCDB B06 38361 Danilovgrad, bara Moromiš 42.5322N, 19.1993E DCDDJ018- 21/OL870243 90 CCDB B07 38361 Danilovgrad,  
 bara Moromiš 42.5322N, 19.1993E DCDDJ019- 21/OL870141 91 Piona laminata CCDB A12 38361 Danilovgrad, bara Moromiš  
 42.5322N, 19.1993E DCDDJ012- 21/OL870154 BOLD:AEL3248 92 93 Piona disparilis \* CCDB A08 CCDB A09 38363 38363  
 Nikšić, izvor Vukovo vrelo, bazen Nikšić, izvor Vukovo vrelo, bazen 42.8577N, 18.9416E 42.8577N, 18.9416E SEPTA008-  
 21/OL870284 SEPTA009- 21/OL870114 BOLD:AEE3977 94 Typhis torris \* CCDB-3867-C08 Tuzi, Vitoja, bazen 42.324N,  
 19.3637E DNCBD032- 20/OL870176 BOLD:AEF2208 95 96 Typhis ornatus CCDB 38361 B01 CCDB 38361 B02 Danilovgrad, bara

Moromiš Danilovgrad, bara Moromiš 42.5322N, 19.1993E 42.5322N, 19.1993E DCDDJ013- 21/OL870159 DCDDJ014- 21/OL870264 BOLD:ACS0401 Wettinidae 97 Wettina lacustris 30. M19\_20\_4\_F8 Podgorica, Mareza kanal 42.479N, 19.1813E DNAEC065- 20/OL870165 BOLD:ADL2726 Mideopsidae Broj Naziv taksona ID jedinke Lokalitet (grad, tačna lokacija) Koordinate BOLD/ GenBank ID BIN (Barcode Index Number) 98 99 100 101 102 Mideopsis roztoczensis \* CCDB-38679- A02 CCDB-3867-G05 CCDB38233 C12 CCDB38233 C11 CCDB 38363 D07 Bar, Poseljani, Poseljanski izvor Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž Danilovgrad, rijeka Zeta, Vranjske njive

**42.3095N, 19.0518E 42.4057N, 19.3569E 42.5112N, 19.1991E 42.5112N, 19.1991E 42.4683N, 19.2579E**

3

DNCBD002- 20/OL870166 DNCBD077- 20/OL870298 DCCDB036- 21/OL870179 DCCDB035- 21/OL870122 SEPTA043- 21/OL870110 BOLD:ACI1492 Athienemanniidae 103 Mundamella germanica 1. KIA\_20B\_D6 Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž 42.5113N, 19.1982E DNAEC041- 20/OL870286 BOLD:AED6269 Aturidae 104 CCDB 38363 B01 Bar, Skadarsko jezero, Murići 42.1637N, 19.2214E SEPTA013- 21/OL870209 105 Hexaxonopsis serrata \* CCDB 38363 B02 Bar, Skadarsko jezero, Murići 42.1637N, 19.2214E SEPTA014- 21/OL870132 BOLD:AEN2897 106 CCDB 38363 B03 Bar, Skadarsko jezero, Murići 42.1637N, 19.2214E SEPTA015- 21/OL870163 Broj Naziv taksona ID jedinke Lokalitet (grad, tačna lokacija) Koordinate BOLD/ GenBank ID BIN (Barcode Index Number) 107 Parabrachypoda montii 5. M19\_20\_6\_D9 Podgorica, Mareza kanal 42.479N, 19.1813E DNAEC044- 20/OL870174 BOLD:AED5455 Arrenuridae 108 Arrenurus cylindratu \* 34. M19\_20\_1\_F12 Podgorica, Mareza kanal 42.479N, 19.1813E DNAEC069- 20/OL870239 BOLD:AED6864 109

**Arrenurus refractarioulus CCDB 38363 A07 Nikšić** , planina **Lukavica** , bare **42.8118N, 19.1872E**

3

SEPTA007- 21/OL870158 BOLD:AEN2842 3.2.5 Filogenetski odnosi vodenih grinja roda Atractides Za detaljniju rekonstrukciju filogenetskih odnosa vodenih grinja, odabran je rod Atractides, koji je drugi najbrojniji rod u ovoj disertaciji. Osim DNK barkodova iz Crne Gore, u filogenetsku analizu uključeni su COI barkodovi iz Austrije, Italije, Njemačke, Švajcarske i Irana (Prilog 3). Konačni set središnjih i poravnatih sekvenci sadržao je 73 COI sekvenci ukupne dužine 588 nukleotida. Nukleotidne sekvence mogu se prevesti u aminokiseline bez stop kodona. U ovom setu podataka, varijabilno je 323 nukleotidnih mjesta. Bajesijanskom metodom implementiranom u programu BEAST ver. 1.10.4 rekonstruisano je filogenetsko stablo (Slika 38), a na čvorovima su prikazane vrijednosti posteriorne vjerovatnoće. Konačni set podataka sadržao je 21 poznatih vrsta Atractides, uključujući nedavno opisanu novu vrstu za nauku - Atractides anae (sa područja Crne Gore i Bugarske). Od trinaest vrsta, čije sekvence su dio referentne baze DNK barkodova Crne Gore, devet je zabilježeno u slivu Skadarskog jezera (Tabela 15). Filogenetskom rekonstrukcijom stabla izdvojene su tri subklade. Prvu subkladu čini deset različitih vrsta Atractides. Prvi sestrinski klaster čine vrste A. inflatus i A. gibberipalpis. Sekvence vrste A. nodipalpis grupišu se u dvije filogenetske linije. Sekvence A. nodipalpis iz Crne Gore čine sestrinsku grupu A. robustus. Sekvence A. nodipalpis iz Njemačke grupišu se sa sekvencom A. protendens. Ova vrsta u našem setu podataka posjeduje dva različita BIN-a, što odgovara rezultatima filogenetske analize. U ovoj subkladi, izdvaja se podgrupa koju čine sekvence vrsta A. walteri i A. vaginalis, koje se grupišu sa

sekvencama *A. brendle*/*A. macrolaminatus-loricatus* i *A. separatus* (Slika 38). Drugu subkladu čine vrste *A. latipes* i *A. inflatipes*, koje su na stablu predstavljene kao sestrijske (Slika 38). Treću subkladu čini devet prethodno opisanih vrsta roda *Atractides* (Slika 38). Jedna COI sekvenca nedavno opisane nove vrste za nauku, *A. anae*, grupiše se sa sekvencama vrste *A. pennatus*. Ovoj podgrupi najrodnije su vrsta *A. fonticulus* i *A. inflatipalpis*. Susjedna podgrupa je ona koju čine vrste *A. fissus* i *A. panniculatus* (Slika 38). Kao spoljna linija izdvaja se *A. fluviatilis*. Podgrupa koju čine sekvence vrsta *A. stankovici* i *A. mossahebia* predstavlja odvojeni klaster. Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (...) i Hydrachnidia (...) na području sliva Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022.

Slika 38. Filogenija roda vodenih grinja *Atractides* generisana korišćenjem Bajesijanske analize koja je obuhvaćena programom BEAST ver. 1.10.4. Brojevi na čvorovima predstavljaju vrijednosti posteriorne vjerovatnoće. Kodovi haplotipova odgovaraju Blattner et al. (2019) i podacima iz disertacije (Tabela 17 i Prilog 3). 104 | s t r . 3.2.6 Genetička varijabilnost sekvenci vodenih grinja *Atractides* Koch, 1837 Osnovni parametri genetičkog diverziteta roda *Atractides* dati su u tabeli 16. Pomoću softvera DnaSP ver. 6.0 detektovano je 44 različitih haplotipova u analiziranom setu podataka, uključujući haplotip *Hygrobatas marezaensis*, kao outgrupe (Tabela 16 i 17). Tabela 16: Osnovni parametri genetičkog diverziteta populacija vodenih grinja roda *Atractides* N (broj uzoraka) Nh (broj različitih haplotipova)

**Hd (diverzitet haplotipova)  $\pi$  (diverzitet nukleotida) k** (prosječan broj nukleotidnih razlika

12

) VPS (varijabilna polimorfna mjesta) PIS (informativna mjesta za parsimoniju) 74 44 0.975 0.39 85.04440 217 185 Konačni set podataka u ovoj analizi uključio je 73 sekvence roda *Atractides*, od kojih 35 pripada referentnoj bazi barkodova „MNEHYD“. U slivu Skadarskog jezera, jedinke vrsta vodenih grinja roda *Atractides* nose 10 različitih haplotipova (Hap\_25, Hap\_26,

**Hap\_30, Hap\_32, Hap\_33, Hap\_34, Hap \_35, Hap \_36, Hap\_42 i Hap\_43**

32

) (Prilog 3). Diverzitet COI haplotipova iznosio je Hd = 0.975. U okviru 74 COI sekvenci bilo je 217 polimorfni mjesta, od kojih je 185 parsimonijski informativno. Najveći broj jedinki (9) nosi haplotip Hap\_36, koji uz haplotip Hap\_37, pripada vrsti *A. pennatus*. Sve jedinke *A. pennatus* iz sliva Skadarskog jezera nose zajednički haplotip Hap\_36, a jedinka nađena u izvoru u sjevernom dijelu Crne Gore (izvor Studenac, Durmitor) nosi Hap\_37. Po četiri jedinke nose Hap\_13 (*A. vaginalis*). Sve ostale haplotipove nose manje od po tri jedinke (Tabela 17). Jedinke vrsta vodenih grinja *A. robustus*, *A. vaginalis* i *A. walteri* nose najveći broj različitih haplotipova (po četiri) (Slika 38). Jedinke vrste *A. gibberipalpis* i *A. fissus* nose po tri haplotipa, dok jedinke vrste *A. brendle*, *A. fonticulus*, *A. panniculatus*, *A. pennatus* i *A. stankovici* nose po dva haplotipa. Sve preostale vrste predstavljene su sa po jednim haplotipom (*A. anae*, *A. fluviatilis*, *A. inflatipalpis*, *A. inflatipes*, *A. inflatus*, *A. latipes*, *A. macrolaminatus / loricatus* gr., *A. mossahebia* i *A. protendens*). Haplotipove vrste *A. nodipalpis* iz Njemačke i Crne Gore razdvaja veliki broj mutacijskih koraka (Slika 39). Značajno manji broj mutacijskih koraka razdvaja haplotipove *A. fissus* iz Austrije (Hap\_20) i Crne Gore (Hap\_23 i Hap\_24) (Slika 39), kao i haplotipove *A. gibberipalpis* iz Njemačke (Hap\_18) i Crne Gore (Hap\_27 i Hap\_28). Najmanji broj koraka razdvaja haplotipove *A. fonticulus* iz Njemačke i Crne Gore (Hap\_19 i Hap\_26) (Slika 39). Osim toga, među

haplotipovima *A. nodipalpis* iz Crne Gore (Hap\_33 i Hap\_34) zabilježen je veliki broj mutacijskih koraka, koji je potvrđen i rekonstrukcijom filogenetskog stabla. Uz *A. gibberipalpis*, ovo su jedine vrste roda *Atractides* koje su u BOLD bazi prisutne sa dva BIN-a. Tabela 17: Haplotipovi za COI sekvence vodenih grinja *Atractides* Broj Vrsta Haplotip Sekvence 1 *Atractides walteri* AUS Hap\_1 MK889691 2 *Atractides walteri* AUS Hap\_2 MK889682 3 *Atractides walteri* AUS Hap\_3 MK889636; MK889685 4 *Atractides walteri* AUS Hap\_4 MK889681; MK889683 5 *Atractides separatus* AUS/GER Hap\_5 MK889637; MK889602 6 *Atractides macrolaminatus/loricatus* grupa AUS Hap\_6 MK889686 7 *Atractides brendle* GER Hap\_7 MK889750; MK889742; MK889741 8 *Atractides brendle* GER Hap\_8 MK889749 9 *Atractides nodipalpis* GER Hap\_9 MK889743; 10 *Atractides nodipalpis* GER Hap\_10 MK889744 11 *Atractides vaginalis* GER/SW Hap\_11 MK889603; MK889540 12 *Atractides vaginalis* IT Hap\_12 MK889572 13 *Atractides vaginalis* SW Hap\_13 MK889543; MK889539; MK889531 14 *Atractides vaginalis* SW Hap\_14 MK889532 15 *Atractides protendens* GER Hap\_15 MK889645; MK889646 16 *Atractides panniculatus* GER Hap\_16 MK889653; MK889652; MK889651; MK889650 17 *Atractides panniculatus* GER Hap\_17 MK889649 18 *Atractides gibberipalpis* GER Hap\_18 MK889727 19 *Atractides fonticulus* GER Hap\_19 MK889711; MK889710; MK889709 20 *Atractides fissus* AUS Hap\_20 MK889707; MK889706 21 *Atractides mossahabii* IR Hap\_21 OM321057; OM321065 22 *Atractides anae* MN Hap\_22 OL870229 23 *Atractides fissus* MN Hap\_23 OL870148 24 *Atractides fissus* MN Hap\_24 OL870296 25 *Atractides fluviatilis* MN Hap\_25 OL870211 26 *Atractides fonticulus* MN Hap\_26 OL870291; OL870079 27 *Atractides gibberipalpis* MN Hap\_27 OL870111 28 *Atractides gibberipalpis* MN Hap\_28 OL870115 29 *Atractides inflatipalpis* MN Hap\_29 OL870164 30 *Atractides inflatipes* MN Hap\_30 OL870205 31 *Atractides inflatus* MN Hap\_31 OL870097 32 *Atractides latipes* MN Hap\_32 OL870105 33 *Atractides nodipalpis* MN Hap\_33 OL870084 34 *Atractides nodipalpis* MN Hap\_34 OL870182; OL870145 35 *Atractides nodipalpis* MN Hap\_35 OL870210 36 *Atractides pennatus* MN Hap\_36 OL870283; OL870150; OL870135; OL870285; OL870230; OL870126; OL870206; OL870274; OL870260; 37 *Atractides pennatus* MN Hap\_37 OL870138 38 *Atractides robustus* MN Hap\_38 OL870295; OL870178; 39 *Atractides robustus* MN Hap\_39 OL870094 40 *Atractides robustus* MN Hap\_40 OL870301 41 *Atractides robustus* MN Hap\_41 OL870212 42 *Atractides stankovici* MN Hap\_42 OL870245; OL870231; OL870242 43 *Atractides stankovici* MN Hap\_43 OL870189 44 *Hygrobates marezaensis* Hap\_44 N/A Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (...) i Hydrachnidia (...) na području sliva Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022. Slika 39. Mreža haplotipova (eng. median joining network) konstruisana u programu NETWORK ver. 4.2.0.1 sa 73 COI sekvenci vodenih grinja roda *Atractides*. Veličina krugova proporcionalna je frekvenciji predstavljenog haplotipa. Oznake haplotipova koje nose jedinke date su u Tabeli 14. 108 | s t r . 4. DISKUSIJA Posljednjih godina, metoda DNK barkodinga zastupljena je u brojnim istraživanjima širom svijeta. Rezultatima ovog istraživanja, započeti su prvi koraci u formiranju baze DNK barkodova pijavica i vodenih grinja Crne Gore. Udjeli od oko 42 % barkodiranih svih poznatih pijavica porodice Glossiphoniidae i 43 % svih poznatih vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia), predstavljaju dobar temelj dugotrajnog procesa barkodiranja faune Crne Gore. Po prvi put, BOLD baza dopunjena je javno dostupnim COI barkodovima pijavica *Glossiphonia* iz Crne Gore. Zabilježeno je 92 % novih DNK barkodova vodenih grinja sa teritorije Crne Gore. Naime, u trenutku pisanja ove disertacije, od 252 svih javno dostupnih DNK barkodova vodenih grinja sa područja Crne Gore u BOLD bazi, 232 barkoda rezultat su nedavno formiranog seta podataka "MNEHYD". Našim istraživanjem značajno je povećan broj DNK barkod sekvenci iz Crne Gore, i samim tim, olakšan nastavak korištenja ove metode u procesima određivanja vrsta pijavica i vodenih grinja. Zahvaljujući kombinovanoj metodi morfološke analize i identifikacije DNK barkodingom, otkriveno je postojanje dvije odvojene filogenetske linije u okviru poznatih vrsta pijavica *G. nebulosa* i *G. concolor*. Zahvaljujući kombinovanoj metodi

morfološke analize i identifikacije DNK barkodingom, otkriveno je prisustvo novih vrsta vodenih grinja u fauni Crne Gore. Prvi put u Crnoj Gori zabilježene su sljedeće vrste: *Lebertia reticulata*, *Atractides latipes*, *Parabrychypoda montii* i *Atractides inflatipalpis*. Prve tri vrste nađene su u slivu Skadarskog jezera. Pored toga, otkriveno je prisustvo novih vrsta vodenih grinja za Balkansko poluostrvo. Registrovani su nalazi vrsta *Piona laminata*, *Unionicola ypsilophora* i *Protzia octopora*, koje do sada nijesu zabilježene na ovom prostoru. Prve dvije vrste nađene su u slivu Skadarskog jezera. Konačno, u posljednje dvije godine, na osnovu rezultata integrativne metode, lista vodenih grinja Crne Gore proširena je opisivanjem šest novih vrsta za nauku: *Atractides anae* Pešić et al.

[2020, Hygrobat](#) [Hygrobat](#) [limnocrenicus Pešić 2020](#) , [Hygrobat](#) [mediterraneus Pešić 2020, Mideopsis milankovici Pešić](#) & Smith, [2020](#) i [Sperchon milisai Pešić](#) [2021 \(Pešić et al. 2020a, Pešić et al . 2020b, Pešić et al . 2020c, Pešić](#)

3

et al. 2020d, Pešić i Smit. 2020, Pešić 2022). 4.1 Morfološka, filogenetička i filogeografska analiza pijavica porodice Glossiphoniidae Morfološka analiza ispitivanih jedinki roda *Glossiphonia* sa područja sliva Skadarskog jezera, potvrdila je prisustvo kosmopolitske vrste *G. complanata*. Sa područja zapadnog Balkana, osim pomenute vrste, zabilježeni su nalazi *G. balcanica* i *G. nebulosa*. Sa tipskog lokaliteta u Njemačkoj, potvrđen je nalaz vrste *G. concolor*. Korištenjem metode DNK barkodinga, utvrđena je nedosljednost dosadašnjeg shvatanja diverziteta pijavica baziranog isključivo na morfološkim karakteristikama. Različitim filogenetskim metodama, na osnovu 52 COI sekvence, analizirane su četiri vrste nominalnog roda *Glossiphonia*: *G. complanata*, *G. balcanica*, *G. concolor* i *G. nebulosa*. Jedinke preuzete iz zbirke NHM, koji su označene kao *G. paludosa* i *G. pulchella*, isključene su iz dalje analize zbog kontaminacije DNK (koja se podudarala sa vrstom *G. complanata*) i/ili pogrešne morfološke identifikacije ovih jedinki,. Kosmopolitska vrsta *Glossiphonia complanata*, prisutna je sa dvije podvrste, nominalnom *G. c. complanata* i *G. c. maculosa*, do sada poznatoj jedino iz Ohridskog jezera (Sket, 1968). Suprotno očekivanjima, rezultati rada pokazali su da je javno dostupna sekvenca *G. complanata* (MK479262) iz Hrvatske, bliska subkladi *G. c. maculosa* iz Ohridskog jezera. Jedinica koja odgovara ovoj sekvenci, sakupljena je u rijeci Gacki (Otočac) u Hrvatskoj, a objavljena u radu Mack & Kvist (2019). Pomenuti autori navode visoku genetičku varijabilnost, između jedinke sakupljene na ovom lokalitetu i preostalih jedinki sa područja Hrvatske, što sugerše da je riječ o odvojenoj filogenetskoj liniji (Mack & Kvist 2019). Detaljnija morfološka analiza navedenih jedinki omogućila bi provjeru da li morfologija podržava rezultate genetičke analize. Ovim istraživanjem, prvi nalaz podvrste *G. c. maculosa* zabilježen je u Prespanskom jezeru. Naime, samo jedna jedinka sakupljena je u ovom jezeru (LCHME024-20). Na osnovu karakteristične boje tijela, opisana je kao pomenuta podvrsta iz Ohridskog jezera. Albrecht et al. (2008) ističu visok stepen izolacije endema Ohridskog jezera, sa relativno malim preklapanjima sa faunom Prespanskog jezera. COI analizom utvrđeno je da jedinka iz Prespanskog jezera formira klaster sa jedinkama iz Ohridskog jezera, uz vrijednost K2P distance od 1.49 %. To ukazuje na postojanje određenog nivoa genetske izolacije populacija iz ova dva balkanska jezera. Međutim, potrebno je više uzoraka, uključujući i lokalitete iz Hrvatske, kako bi ova pretpostavka bila podržana i kako bi se procijenile morfološke varijacije unutar ove klade. Našim istraživanjem, ukazano je da su određene jedinke, koje su u ovom setu podataka predstavljene javno dostupnim sekvencama, vjerovatno pogrešno identifikovane. Sekvence dvije jedinke iz neimenovane rijeke u Hrvatskoj (Mack & Kvist, 2019), kao i sekvenca iz rijeke Sade u



Italiji (Sidall et al. 2005), koje su označene kao *G. verrucata*, u našem filogenetskom stablu čine dio klade *G. cf. nebulosa*. Na navedeno, ukazali su Kaygorodova et al. (2020), tvrdeći da se pomenuta jedinka iz Italije genetski jasno odvaja od sibirskih pijavica koje morfološki odgovaraju vrsti *G. verrucata*. Ova vrsta je rasprostranjena uglavnom na sjevernom Palearktiku (Jueg, 2013) sa nekoliko nalaza iz centralne Evrope, od Bavarske do Mađarske (Nesemann 1997, Nesemann & Neubert, 1999). Rezultati rada Kaygorodove et al. (2020), na osnovu metoda za razdvajanje vrsta, pokazali su da jedinke iz Italije i Rusije (Sibira) pripadaju različitim vrstama. Nažalost, za jedinke iz Italije i Hrvatske, objavljenim pod imenom *G. verrucata*, nedostaju podaci o morfološkim karakteristikama korištenim za njihovu identifikaciju. Iz tog razloga, neophodno je detaljnije taksonomsko tumačenje ove klade (u radu označenom kao *G. cf. nebulosa*). Rezultatima našeg istraživanja otkriveno je da se *G. nebulosa* sastoji od dvije filogenetske klade, dovodeći u pitanje status populacija sa Zapadnog Balkana. Srednja vrijednost 4.9 % K2P distance razdvaja sjeverno-centralno evropsku kladu, koja sadrži jedinku sa locus *typicus*-a ove vrste iz Njemačke, i klade koja sadrži jedinke sa Balkana. Ovo ukazuje na dugogodišnju izolaciju između populacija iz sjeverno-centralne Evrope i jugoistočne Evrope. Grosser et al. (2016) ukazali su na morfološke razlike između populacija *G. nebulosa* sa tipskog lokaliteta i onih sa Kosova. Iz tog razloga, treba sakupiti dodatni materijal, kako bi se razjasnio taksonomski status populacija sa Zapadnog Balkana. Rezultati analiza sa ciljem razdvajanja vrsta nijesu dali ubjedljive zaključke. Na primjer, mPTP analiza spaja *G. concolor* i *G. baicalensis* u jednu vrstu, što je malo vjerovatno, upoređujući K2P distance između ove dvije filogenetske linije (6.14 %), sa drugim inter- i intraspecifičnim distancama unutar ovog roda. Još jedan neočekivan rezultat odnosi se na *G. complanata* i *G. balcanica*; srednja K2P interspecifična distanca između *G. balcanica*, endema kojeg su opisali Grosser et al. (2016), i široko rasprostranjene *G. complanata*, iznosi 3.17 %. ASAP analiza grupisala je COI sekvence ove dvije vrste zajedno, što nije u skladu sa morfološkim razlikama pomenutih vrsta. Morfološki, *G. balcanica* prilično se razlikuje od *G. complanata*, a veoma podsjeća na *G. cf. nebulosa*, sa kojom živi sintopično u nekim staništima (detaljnije opisano u Grosser et al. 2016). Filogenetski, *G. balcanica* i *G. complanata* pripadaju različitim kladama, sa visokim vrijednostima podrške, što ukazuje na to da je interspecifični prag u ASAP analizi analiziranog skupa podataka nerealističan. Najvjerovatnije nastaje kao rezultat potcjenjivanja diverziteta vrsta (Yu et al. 2017) ili procjene relativno velike „barkoding praznine“ vrsta koje su se relativno skoro razdvojile (Kvist et al. 2010). Prema Puillandre et al. (2021), ASAP analiza daje najbolje rezultate kada su vrste predstavljene sa najmanje 3 do 5 sekvenci. Potencijalni razlog za spajanje ove dvije vrste može biti taj da je *G. balcanica* predstavljena sa dvije sekvence, naspram mnoštvo sekvenci *G. complanata*. Na kraju, kao što je nedavno naglašeno od strane Puillandre et al. (2021), i ostale karaktere, a ne isključivo granične vrijednosti sa najboljim ASAP rezultatom, treba uzeti u obzir pri konačnom razdvajanju vrsta. Dobijena „barkoding praznina“ od 4-8 % K2P u našem analiziranom setu podataka, može se uporediti sa rezultatima rada Kaygorodova et al. (2020) od 5-7 %, koja je prihvaćena kao pogodna za identifikaciju sibirskih vrsta pijavica iz roda *Glossiphonia*. Rezultatima ovog istraživanja naglašen je značaj primjene molekularno-genetičkih metoda u procjeni genetskog diverziteta roda *Glossiphonia*. Izgradnja DNK referentne biblioteke barkodova za ovu grupu beskičmenaka, obezbijediće bolje razumijevanje distribucije i razdvajanja vrsta iz ovog roda na ispitivanom području. Filogeografska analiza pomoću mreže haplotipova pokazala se primjerenom za utvrđivanje filogeografskih odnosa između srodnih haplotipova pijavica *G. complanata*. Ova analiza je pokazala udruživanje haplotipova sa lokaliteta iz istih geografskih područja. Većina haplotipova unutar *G. complanata*, združena je u četiri grupe, koje sa određenim odstupanjima, odgovaraju geografskom rasporedu ispitivanih lokaliteta.

#### 4.2 Morfološka, filogenetička i filogeografska analiza vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia)

Rezultati ovog rada potvrđuju značaj upotrebe molekularnih podataka u dopuni morfološke identifikacije vodenih grinja.

Metodom DNK barkodinga analizirane su 232 jedinke Hydrachnidia sa cjelokupne teritorije Crne Gore, koje predstavljaju 86 identifikovanih vrsta iz 28 rodova i 17 porodica. Sa područja sliva Skadarskog jezera, na osnovu morfološke analize i identifikacije DNK barkodingom, zabilježene su 52 vrste vodenih grinja. Ovaj broj identifikovanih vrsta vodenih grinja naročito je značajan, ukoliko se uzme u obzir da je trenutno znanje o molekularnim karakteristikama vodenih grinja relativno oskudno. Prema rezultatima studije Paláez et al. (2022), u javnim bazama podataka do 2019. godine bili su dostupni podaci za samo 3 % poznatih vrsta (203 barkodirane vrste). Glavni nedostatak javno dostupnih baza podataka je taj što većina jedinki nije identifikovana do nivoa vrsta (90 %) (Paláez et al. 2022). Na osnovu COI analize 109 sekvenci (55 BIN-ova) vodenih grinja, koje su sakupljene na području sliva Skadarskog jezera, može se zaključiti da su rezultati u skladu sa važećom taksonomijom vodenih grinja. Filogenetski odnosi rekonstruisani su pomoću metode susjednog sparivanja (NJ) na osnovu fragmenata mitohondrijskog COI gena. U rekonstruisanom filogenetskom stablu, jedinke koje pripadaju morfološki identifikovanim vrstama teže grupisanju u klade. Istovremeno, jedinke koje pokazuju velike intraspecifične udaljenosti, osim što posjeduju različite BIN-ove, jasno su razdvojene u različite subklade / klade. Za detaljniju rekonstrukciju filogenetskih i odnosa, odabran je rod *Atractides*, jedan od najbrojnijih rodova vodenih grinja u ovoj disertaciji. Konačan set podataka sadrži 73 COI sekvence, koje predstavljaju 21 vrstu. Trinaest vrsta predstavlja faunu Crne Gore, a od tog broja, devet je pronađeno u slivu Skadarskog jezera. Rekonstrukcijom filogenetskog stabla, sekvence koje pripadaju rodu *Atractides* grupisane su klade koje odgovaraju prethodno poznatim vrstama. Pomoću mrežne analize haplotipova, u ovom setu podataka, registrovano je 43 haplotipova, koji podržavaju rezultate filogenetičke analize. Sa druge strane, kao što je istaknuto u studiji Blattner et al. (2019), iako je COI gen pogodan za identifikaciju vrsta i najrasprostranjeniji je marker za ovu grupu beskičmenjaka, za svrstavanje vodenih grinja u više taksonomske kategorije neophodno je uključiti i druge markere. Ova tvrdnja potvrđena je i našim rezultatima, gdje su na osnovu samo jednog mitohondrijskog markera, pojedine više taksonomske kategorije (npr. rodovi, porodice i nadporodice) grupisane suprotno prihvaćenoj taksonomiji. Na primjer, predstavnici porodice Sperchontidae (*Sperchon thienemanni*) i Hydrodromidae (*Hydrodroma reinhardi*) teže grupisanju sa članovima nadporodice Arrenuroidea (koju čine porodice Arrenuridae, Athienemannidae i Mideopsidae), umjesto prihvaćenim Lebertioidea, odnosno Hydryphantoidea. Na kraju, jedan broj porodica prisutan je samo sa po jednom jedinkom u ovom filogenetskom stablu (npr. Limnocharidae, Hydryphantidae, Aturidae, Hydrodromidae itd.), što nije dovoljan broj jedinki za svrstavanje vrsta u više taksonomske kategorije. Osim toga, treba naglasiti da se korišćenjem fragmenata COI gena u molekularno- genetičkim analizama, mogu pronaći razlike u morfološkim i genetičkim rezultatima. Na primjer, molekularni podaci mogu da identifikuju majčinsku vrstu hibrida koji dijeli morfologiju očinske vrste, što dovodi do neslaganja između ove dvije vrste podataka (Paláez et al. 2018). To može dovesti do grešaka i u tumačenju filogenetskih odnosa i/ili dovesti u pitanje pouzdanost javno dostupnih baza podataka za identifikaciju vrsta (Linder & Rieseberg, 2004).

#### 4.3. Otkrivanje kriptičnih i/ili pseudokriptičnih vrsta vodenih grinja

U BOLD bazi, jedinstveni BIN-ovi dodijeljeni su za 73 vrste (84.8 %), dok 11 vrsta (12.8 %) sadrže po dva BIN-a, a 2 vrste (2.3 %) karakteriše po 3 BIN-a. Posljednjih 13 vrsta, kojima su dodijeljena dva ili tri različita BIN-a, posjeduju visoku intraspecifičnu udaljenost (> 2.2 %), što ukazuje na postojanje eventualnih kriptičnih i/ili pseudokriptičnih vrsta vodenih grinja, sakrivenih unutar poznatih vrsta. Osim toga, naši rezultati potvrđuju da je kriptična specijacija rasprostranjena kod vodenih grinja, kao što su ranije naveli Scoracka et al. (2015). Ovaj proces rezultira vrstama koje su morfološki identične, ali uglavnom reproduktivno izolovane. U posljednje vrijeme, kriptična specijacija se sve više proučava, što doprinosi ponovnom uspostavljanju prethodno sinonimiziranih taksona vodenih grinja (Stålstedt et

al. 2013, García-Jiménez et al. 2017, Pešić et al. 2017

25

). Brojne studije naglašavaju da je jaz između interspecifičnih i intraspecifičnih divergencija kod vodenih grinja veći u poređenju sa drugim grupama beskičmenjaka, što sugerise da je potrebno pojedinačno procijeniti svaki set podataka (

Martin et al. 2010, Stålstedt et al. 2013, Blattner et al. 2019

29

). U našoj bazi podataka, dvije vrste, *Lebertia inaequalis* i *Lebertia glabra*, pojavljuju se sa po tri različita BIN-a. *L. inaequalis*, vrsta koja je poznata sa šireg područja Paleartika, u ovom setu podataka predstavljena je sljedećim BIN-ovima: BOLD:AEF5913, BOLD:AEF2742 i BOLD:ADF6223 (Tabela 18). Prva dva BIN-a, u BOLD bazi sadrže samo jedinke iz Crne Gore. Treći BIN, prema podacima ove baze, znatno je frekventniji i uključuje barkodove iz Holandije, Poljske i Crne Gore. Njegova vrijednost intraspecifične K2P distance sa prvim klasterom, procijenjena je na samo 0.1 %, dok je ova vrijednost prema drugom klasteru 17.3 %. Na osnovu toga, zaključuje se da je neophodna dodatna detaljna morfološka i molekularna analiza jedinki ove vrste. *Lebertia glabra*, široko rasprostranjena vrsta u zapadnom Paleartiku, predstavljena je sa tri različita BIN-a (BOLD:ACR9598, BOLD:ACS0595 i BOLD:AEI2925). Prvi klaster (BOLD:ACR9598), uključuje ukupno dvije jedinke, po jednu iz Crne Gore i Holandije. Drugi klaster uključuje barkodove širom Evrope – Holandije, Poljske, Italije, Makedonije i Crne Gore. Treći klaster sadrži samo tri jedinke iz Crne Gore. Vrijednosti intraspecifičnih K2P distanci u opsegu su od 14.3 do 17.7 % (Tabela 18). *Lebertia maculosa*, *Monatractides madritensis* i *Torrenticola laskai*, u ovoj bazi podataka pojavljuju se sa po dva BIN-a. Intraspecifična maksimalna udaljenost kod sve tri vrste bila je manja od 3 % (Tabela 18). Kod preostalih devet vrsta, maksimalna intraspecifična udaljenost između BIN-ova veća je od 5 %, što ukazuje da je potrebna dodatna analiza svih navedenih vrsta. Osim toga, potrebno je razjasniti mehanizme i procese koji se odnose na komplekse kriptičnih / pseudokriptičnih vrsta. *Lebertia porosa*, često je zabilježena u stajaćim vodama i bazenima širom Holartika (Gerecke, 2009, Di Sabatino et al. 2010). Stur (2017) pokazala je da 18 jedinki *L. porosa* iz Norveške sadrži 7 BIN-ova sa srednjom intraspecifičnom p-distancom od 11.7 % i maksimalnom distancom do 18.5 %. U ovom setu podataka, jedinke *L. porosa* predstavljene su sa dva BIN-a. Prvi BIN (BOLD:ACS0974) u BOLD bazi predstavljen je sa 133 nalaza iz različitih dijelova Evrope. Drugi BIN (BOLD:AED4662), sadrži isključivo jedinke iz Crne Gore (Tabela 18). Između ostalog, jedinke koje su predstavljene ovim BIN-om pronađene su u limnokrenim izvorima (Mareza i Vitoja). Sa druge strane, vrste sa prvim opisanim BIN-om (BOLD:ACS0974), nađene su u nižim tokovima. Intraspecifična K2P distanca između ova dva klastera procijenjena je na najmanje 5.5 %. *Sperchon brevirostris*, u ovom setu podataka prisutan je sa dva klastera. Intraspecifična K2P distanca koja razdvaja klaster iznosi 8.1 %. Prvi klaster čine jedinke iz Norveške, Njemačke i jedna jedinka iz Crne Gore (BOLD:ACP6107); drugi klaster čine tri jedinke iz Crne Gore i Sjeverne Makedonije (BOLD:AED3857) (Tabela 18). *Sperchonopsis verrucosa*, vrsta koja je česta u Holartiku (Gerecke et al. 2016), u ovom setu podataka zastupljena je sa dva klastera. Prvi klaster (BOLD:ACS9705), u BOLD bazi podataka sadrži barkodove jedinki iz Norveške, Italija i jedne iz Crne Gore. Drugi klaster (BOLD:AEK8297) sadrži dvije jedinke iz Crne Gore i Rumunije. Vrijednost intraspecifične K2P distance između ova dva klastera iznosi 11.2 %, što ukazuje na neophodnu dodatnu integrativnu analizu. *Torrenticola meridionalis*, vrsta koja je prvobitno opisana

u Italiji, široko je zastupljena u Crnoj Gori, naseljavajući većinom donje tokove (Pešić et al. 2018a). U ovom setu podataka, predstavljena je sa dva BIN-a (BOLD:AEI3402 i BOLD:AED7519) (Tabela 18), sa intraspecifičnom K2P distancom od 6.6 %. *Atractides gibberipalpis*, ritrobiont koji se često srijeće u Palearktiku (Pešić et al. 2021a), u ovom setu podataka predstavljena je sa dva različita barkoding klastera (BOLD:AEK7766 i BOLD:AEI3946), čija je intraspecifična K2P distanca procijenjena na 5 %. *Atractides nodipalpis*, najčešća je vrsta ovog roda u Evropi, prema Gerecke et al. (2016). U ovom setu podataka, ova vrsta predstavljena je sa dva klastera (BOLD:ACR0209 i BOLD:AED3547). Prvi klaster u BOLD bazi predstavljen je sa 41 jedinkom iz Norveške (zemlja tipskog lokaliteta), Holandije, Rusije, Crne Gore, ali i Grenlanda. Drugi klaster uključuje dvije jedinke iz Crne Gore (Tabela 18). S obzirom da je vrijednost K2P intraspecifične distance 18.8 %, jasno je da neophodna opsežna revizija unutar ovog kompleksa vrsta. *Hygrobatas calliger*, široko rasprostranjena vrsta u Palearktiku (Di Sabatino et al. 2010), u ovom setu podataka predstavljena je sa dva barkoding klastera (BOLD:AEF4261 i BOLD:AEL5782) (Tabela 18). Prvi klaster čine jedinke iz Norveške i Crne Gore, a drugi jedinke iz Njemačke i Crne Gore. Vrijednost K2P intraspecifične distance od 20.9 %, ukazuje na prisustvo potencijalno kriptičnih i/ili pseudokriptičnih vrsta. *Unionicola minor*, široko rasprostranjena vrsta u Evropi (Gerecke et al. 2016), posljednja je vrsta u ovom setu podataka sa dva klastera (BOLD:AAU0335 i BOLD: AEF4865). Prvi klaster obuhvata jedinke iz Norveške i Holandije i jednu jedinku iz Crne Gore. Drugi klaster čine tri jedinke iz Crne Gore (Tabela 18). Vrijednost K2P intraspecifične distance 23.8 % ukazuje na postojanje kriptičnih i/ili pseudokriptičnih vrsta unutar ovog kompleksa vrsta. Stålsted et al. (2013) ukazali su da populacija *U. minor* iz Švedske sadrži najmanje tri kriptične vrste, što sugerise da su neophodna dodatna ispitivanja vrsta unutar ovog kompleksa. Tabela 18. Vrste sa maksimalnom intraspecifičnom distancom (ID) > 2.2%. Vrijednosti su izračunate za sve ispitivane sekvence, koristeći alat "procjena najbližeg susjeda" koje su dio bioinformatičke platforme u BOLD-u. Predstavljani su BIN-ovi bazirani na analizi 15-11-2021. Kodovi država (alfa-2 kod): BG = Bugarska, SW = Švajcarska, DE = Njemačka, ES = Španija, FR = Francuska, GB = Ujedinjeno Kraljevstvo, GL = Grenland, IT = Italija, NO = Norveška, NL = Holandija,

ME = Crna Gora, MK = Sjeverna Makedonija, PL = Poljska, RO = Rumunija, RS = Srbija

39

, RU = Rusija, SK = Slovačka. No Vrsta BIN n Sred. Maks. Država1 Najbliži Distan ISD ISD BIN/Vrsta ca

1. **Lebertia glabra BOLD:ACR9598 2 0.8 0.8 ME, NL BOLD:ACS0595 12.52 Lebertia glabra BOLD:ACS0595 20 0.64 1.36 NL, BG, ME, MK, IT, PL, SK BOLD:AEJ3212 2.88 Lebertia glabra BOLD :AEI2925 3 0.64 0.96 ME BOLD:ACO2179 12.02 2. Lebertia inaequalis BOLD:AEF5913 1 N/A N/A ME BOLD:ADF6223 2.78 Lebertia inaequalis BOLD:ADF6223 18 0.18 0.34 NL, PL, ME BOLD:AEF5913 2.78 Lebertia inaequalis BOLD:AEF2742 1 N/A N/A ME BOLD:AEB4193 6.96 3. Lebertia maculosa BOLD:AED9718 3 1.27 1.6 ME, MK BOLD:AED9197 2.76 Lebertia maculosa BOLD:AED9197 2 0.16 0.16 ME BOLD:AED9718 2.76 4. Lebertia porosa BOLD:ACS0974 133 0.81 2.37**

1

Lebertia porosa 5. Sperchon brevisrostris BOLD:AED4662 BOLD:AED3857 12 0.14 3 0.32

NL, FR, ME, DE, GB, BG, IT, PL, SK, ES

3

, SW 0.85 ME 0.48 ME, MK BOLD:AED4662 BOLD:ACS0974 BOLD:AEK3053 3.89 3.89 2.72

Sperchon brevirostris BOLD:ACP6107 28 0.55 3.12 NO, DE, BOLD:AED3857 7.53

1

ME 6. Sperchonopsis verrucosa Sperchonopsis verrucosa BOLD:AEK8297 BOLD:ACS9705

1 N/A N/A ME, RO BOLD:ACS0908 4.83

3

9 0.29 0.97

NO, IT, ME BOLD:ADU8190 9.83 7. Monatractides madritensis BOLD:AED3803 2 0.16 0.16 ME

1

BOLD:AEL3852 1.44 Monatractides madritensis BOLD:AEL3852 2 0.64 0.64 ME, SR BOLD:AED3803 1.44 8.

Torrenticola meridionalis BOLD:AED7519 8 1.46 2.25 ME, MK BOLD:AEI3402 6.57 Torrenticola meridionalis

BOLD:AEI3402 4 1.42 2.09 ME BOLD:AEK9662 6.25 9. Torrenticola laskai BOLD:AEF5471 2 0.32 0.32 ME

BOLD:AED2306 2.17 Torrenticola laskai BOLD:AED2306 4 0.82 1.34 RS, ME, RO BOLD:AEF5471 2.17 Atractides

gibberipalpis BOLD:AEK7766 1 N/A N/A ME BOLD:AEI3946 4.81 10. Atractides gibberipalpis BOLD:AEI3946 1

N/A N/A ME BOLD:AEK7766 4.81

NO, NL, GL, DE, ME, RS BOLD:AED3548 13.3 Atractides nodipalpis BOLD:AED3547 2 0 0 ME BOLD

1

:AAM430 6

13.3 12. Hygrobates calliger BOLD:AEF4261 2 1.2 1.2 NO, ME BOLD:AEK4720 16.18 Hygrobates calliger

1

BOLD:AEL5782 2 1.03 1.03 DE, ME BOLD:AEK4720 14.61 13. Unionicola minor BOLD:AEF4865 3 0.59 0.7

ME BOLD:ACI7165 17.02 Unionicola minor BOLD:AAU0335 7 0.09 0.32 NO, NL, ME BOLD:ACH3803 16.03

5. ZAKLJUČCI Na osnovu integrativnog pristupa, koji uključuje morfološku analizu i identifikaciju DNK barkodingom, koje su sprovedene na pijavicama (porodica Glossiphoniidae) i vodenim grinjama (Hydrachnidia), izvedeni su sljedeći zaključci: •

Metoda DNK barkodinga pokazala se uspješnom u određivanju faune pijavica i vodenih grinja Crne Gore. Uspješno je barkodirano 42 % svih poznatih vrsta pijavica porodice Glossiphoniidae i 43 % svih poznatih vrsta vodenih grinja sa teritorije Crne Gore. • Standardni COI molekularni marker pokazao se veoma značajnim u identifikaciji vrsta pijavica i vodenih grinja. Rezultati nastali rekonstrukcijom filogenetskih stabala pijavica i vodenih grinja, na osnovu COI barkoding regiona, saglasni su sa važećom filogenijom. • Integrativnim pristupom analizirane su 33 jedinke pijavica porodice Glossiphoniidae iz sliva Skadarskog jezera i sa drugih lokaliteta iz šest zemalja: Albanije, Austrije, Bosne i Hercegovine, Kosova, Njemačke i Sjeverne Makedonije. • Morfološkom analizom utvrđeno je prisustvo četiri vrste roda *Glossiphonia*: *G. complanata* (sa dvije podvrste *G. c. complanata* i *G. c. maculosa*), *G. nebulosa*, *G. balcanica* i *G. concolor*. Sekvence morfološki identifikovanih vrsta *Placobdella costata* i *Helobdella stagnalis*, korištene su kao spoljašnje grupe (outgrupe) u filogenetičkim analizama. • Rezultati metode DNK barkodinga, otkrili su postojanje dvije odvojene filogenetske linije u okviru poznatih vrsta *G. nebulosa* i *G. concolor*. • Filogeografska analiza pomoću mreže haplotipova pokazala je udruživanje haplotipova sa lokaliteta iz istih geografskih područja. Haplotipovi vrste *G. complanata* raspoređeni su u četiri grupe, koje odgovaraju subkladama dobijenim rekonstrukcijom filogenetskih stabala. • Pronađena ASAP „barkod praznina“ od 4-8 % K2P genetičke distance prihvaćena je kao pogodna za identifikaciju vrsta roda *Glossiphonia*. • Integrativnim pristupom analizirane su 232 jedinke vodenih grinja (*Hydrachnidia*) sa teritorije Crne Gore, od čega je 109 jedinki sakupljeno na području sliva Skadarskog jezera. Navedene jedinke iz sliva Skadarskog jezera čine 53 operative taksonomske jedinice - OTU, odnosno 55 BIN-ova, u koje ih je razdvojila BOLD platforma. • Na teritoriji Crne Gore, na osnovu rezultata morfološke analize i DNK barkoding identifikacije, zabilježeno je 86 vrsta vodenih grinja. Vrste koje do sada nijesu otkrivene u fauni Crne Gore su: *Lebertia reticulata*, *Atractides latipes*, *Parabranchnyopoda montii* i *Atractides inflatipalpis*. • Po prvi put otkriveni su nalazi vrsta *Piona laminata*, *Unionicola ypsilophora* i *Protzia octopora* u fauni *Hydrachnidia* Balkanskog poluostrva. • Vodene grinje sakupljene su u lotičkim, lentičkim, temporalnim i intersticijalnim staništima. Najveći broj vrsta (79 %) karakterističan je za faunu lotičkih staništa. • • • Pomoću algoritma koji je ponuđen u BOLD platformi, jedinstveni BIN-ovi dodijeljeni su za 73 vrste vodenih grinja (84.8 %), dok 11 vrsta (12.8%) sadrži po dva BIN-a, a 2 vrste (2.3 %) karakteriše po 3 BIN-a. Vrste kojima su dodijeljena dva ili tri različita BIN-a, posjeduju visoku intraspecifičnu udaljenost (> 2.2 %), što ukazuje na prisustvo kriptičnih i/ili pseudokriptičnih vrsta vodenih grinja na istraživanom području. Sve navedeno ističe da je potrebno sprovesti dodatna istraživanja unutar kompleksa vrsta *Lebertia inaequalis*, *Lebertia glabra*, *Atractides nodipalpis*, *Hygrobates calliger*, *Unionicola minor* itd. DNK barkodovi sa svim podacima sačuvani su u svjetskoj bazi podataka BOLD. Stvaranjem DNK referentne baze pijavica i vodenih grinja, značajno će se ubrzati buduća istraživanja ovih grupa beskičmenjaka. Stvorena je dobra osnova za nastavak procesa barkodiranja faune ispred naučno-istraživačkih ustanova Crne Gore.

6. LITERATURA Albrecht C, Wolff C, Glöer P, Wilke T (2008) Concurrent evolution of ancient sister lakes and sister species: the freshwater gastropod genus *Radix* in lakes Ohrid and Prespa. *Hydrobiologia* 615 (1): 157-167. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9555-1> APAWA and CETI (2007) The strategic action plan (SAP) for Skadar/Shkodra Lake Albania & Montenegro. GEF, World Bank, LSIEMP Shkodra-Tirana-Podgorica, Washington, 72 pp Augener H (1937) Hirudineen aus jugoslavischen Seen. *Festschrift zum 60. Geburtstag von Prof. Dr. Embrik Strand*, Riga, 2, 403–413. Avise J (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Cambridge, ZDA, Harvard University Press, 447 str. Avise J, Arnold J, Ball Jr, Bermingham E, Lamb T, Niegel J, Reeb C, Saunders N (1987) Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of the Ecological Systematics*, 18: 489-522. Bader C (1938) Beitrag zur Kenntnis der Verdauungsvorgänge bei Hydracarin. *Revue Suisse Zool.*, 45: 721-806.

Bańkowska A, Kłosowska M, Gadawski P, Michoński G, Grabowski M, Pešić V, Zawal A (2016) Oviposition by selected water mite (Hydrachnidia) species from Lake Skadar and its catchment. *Biologia*, 71 (9), 1027–1033. <https://doi.org/10.1515/biolog-2016-0126>

Barović G, Spalević V, Pešić V, Vujačić D (2018) Physical and geographical characteristics of Skadar Lake Basin. In: Pešić V, Karaman GS, Kostianoy AG (eds) *The Skadar/Shkodra lake environment*. Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland

Bartsch I, Davids C, Deichsel R, Di Sapatino A, Gabrys G, Gerecke R (2007) *Chelicerata: Araneae, Acari I*. In: Gerecke R, editor. *Süßwasserfauna von Mitteleuropa*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Baxevanis A. D & Oullette B. F. F. (2001) *Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins*. Second edition. Wiley-Interscience.

Belozero VN (2009) Diapause and quiescence as two main kinds of dormancy and their significance in life cycles of mites and ticks (Chelicerata: Arachnida: Acari). Part 2. Parasitiformes. *Acarina*, 17 (1), 3–32.

Bermingham E, Moritz C. (1998) Comparative phylogeography. *Molecular Ecology* 7, 367- 369

Bešić Z, Mihailović R (1983) Geomorphology and geology of the Zeta Valley and Skadar Lake area (in Serbian). In: Ivanović B (ed) *Skadar Lake, Book 9 of Scientific meetings*. Montenegrin Academy of Sciences and Arts, Titograd, pp 13–23.

Blanchard R (1905) *Hirudineen aus Montenegro*. *Sitzungsberichte der Boehmischen Gesellschaft der Wissenschaften*, Prag, 1–3.

Blattner L, Gerecke R, von Fumetti S (2019) Hidden biodiversity revealed by integrated morphology and genetic species delimitation of spring dwelling water mite species (Acari, Parasitengona: Hydrachnidia). *Parasites Vectors* 12, 492 <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3750-y>.

Bolotov I, Klass A, Kondakov A, Vikhrev I, Bepalaya Y, Gofarov MY, Filippov BY, Bogan A, Lopes-Lima M, Lunn Z, Chan N, Aksenova O, Dvoryankin G, Chapurina Y, Kim SK, Kolosova Y, Konopleva E, Lee JH, Makhrov A, Palatov D, Sayenko E, Spitsyn V, Sokolova S, Tomilova A, Win T, Zubrii N, Vinarski M (2019) Freshwater mussels house a diverse mussel-associated leech assemblage. *Scientific Reports* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52688-3>

Boskovic M, Popovic M, Alilovic N (2004) Supplement to Skadar Lake geogenesis, its inflow and outlet components and background on its regulation activities. In: BALWOIS conference proceedings, Ohrid, 25–29 May 2004, pp 1–9

Chiangkul K, Trivalairat P, Kunya K, Purivirojkul W (2021) *Placobdelloides tridens* sp. n., a new species of glossiphoniid leech (Hirudinea: Rhynchobdellida) found feeding on captive *Orlitia borneensis* in Thailand, and an update to the host distribution of *P. siamensis*. *Systematic Parasitology* 98 (2): 141-154. <https://doi.org/10.1007/s11230-021-09967-3>

Cichocka JM, Bielecki A, Jabłońska-Barna I, Krajewski Ł, Topolska K, Hildebrand J, Dmitryjuk M, Biedunkiewicz A, Abramchuk A (2021) Sucking of human blood by *Placobdella costata* (O. F. Müller, 1846) (Hirudinida: Glossiphoniidae): Case study with notes on body form. *Ecol Evol.* 11(24):17593-17603. doi: 10.1002/ece3.8261. PMID: 35003625; PMCID: PMC8717304.

Corse E, Meglécz E, Archambaud G, Ardisson M, Martin J, Tougard C, Chappaz R, Dubut V (2017) A from-benchtop-to-desktop workflow for validating HTS data and for taxonomic identification in diet metabarcoding studies. *Molecular Ecology Resources* 17 (6): e146- e159. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12703>

Dabert M, Proctor H, Dabert J (2016) Higher-level molecular phylogeny of the water mites (Acariformes: Prostigmata: Parasitengonina: Hydrachnidia). *Mol Phylogenet Evol.* 101:75–90.

Davids C, Di Sabatino A, Gerecke R, Gledhill T, Smit H, Van der Hammen, H (2007) *Acari: Hydrachnidia I*. In: Gerecke, R. (Ed.), *Süßwasserfauna von Mitteleuropa*, Vol. 7, 2-1, Spektrum Elsevier, München, pp. 241–376.

Darabi Darestani K, Sari A, Khomenko A, Kvist S, Utevsky S (2021) DNA barcoding of Iranian leeches (Annelida: Clitellata: Hirudinida). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research.* 59. 1438-1452. [10.1111/jzs.12538](https://doi.org/10.1111/jzs.12538).

Di Sabatino A, Gerecke R, Smit H, Pesic V, Panesar A (2003) Water mites of the family *Torrenticolidae* (Acari, Actinedida, Hydrachnidia) from the Eastern Mediterranean region. *Archiv für Hydrobiologie Supplement*, 139 (3), 1–39.

Di Sabatino A, Smit H, Gerecke R, Goldschmidt T, Matsumoto N, Cicolani B (2008) Global diversity of water mites (Acari,

Hydrachnidia, Arachnida) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595, 303–315. Di Sabatino A, Gerecke R, Gledhill T, Smit H (2009) On the taxonomy of water mites (Acari: Hydrachnidia) described from the Palaearctic, part 2: Hydryphantoidea and Lebertioidea. *Zootaxa* 2266, 1–34. Di Sabatino A, Gerecke R, Gledhill T, Smit H (2010) Chelicerata: acari II. In: Gerecke R, editor. *Chelicerata: araraneae, Acari I. Süßwasserfauna von Mitteleuropa*. Vols. 7, 2–2. München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag. p. 1–134. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29, 1969–1973. Edgar RC (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 113; <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>. Falniowski A, Szarowska M, Glöer P, Pešić V (2012) Molecules vs morphology in the taxonomy of the Radomaniola/Grossuana group of Balkan Rissoiidea (Mollusca: Caenogastropoda). *J Conchol* 41(1):19–36 Felsenstein J (1973) Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Systematic Biology* 22, 240–249. Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17, 368–376. Fisher JR, Fisher DM, Skvarla MJ, Nelson WA, Dowling APG (2017) Revision of torrent mites (Parasitengona, Torrenticolidae, Torrenticola) of the United States and Canada: 90 descriptions, molecular phylogenetics, and a key to species. *ZooKeys* 701: 1–496. <https://doi.org/10.3897/zookeys.701.13261> Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3 (5): 294–9. Freeland J R (2005) *Molecular ecology*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.: 388 str. García-Jiménez R, Horreo JL, Valdecasas AG (2017) Minimal barcode distance between two water mite species from Madeira Island: a cautionary tale. *Exp Appl Acarol* 72:133– 143. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0147-5> Gerecke R, Benfatti D (2005) The water mites of the genus *Acherontacarus* (Acari, Acherontacaridae): A revision. *Studi Trentini di Scienze Naturali, Acta Biologica*, 81, 53–77 Gerecke R, Tuzovskij P (2001) The water mite *Rutripalpus limicola* Sokolow, 1934: new data on morphology and biology, and considerations on the systematic position of the monotypic family Rutripalpidae (Acari, Hydrachnidia). *Journal of Natural History*, 35, 931–944. Gerecke R (1996) Untersuchungen über die Wassermilben der Familie Hydryphantidae (Acari, Actinedida) in der Westpalaearktis II. Die Wassermilben der Familie Hydryphantidae in den Mittelmeerländern -Systematik, Faunistik, Zoogeographie. *Archiv für Hydrobiologie Supplement*, 77 (3/4), 337–513. Gerecke R (1999) Further studies on hydryphantoid water mites (Acari: Hydrachnidia) in the W palaearctic region. *Archiv für Hydrobiologie Supplement*, 121 (2), 119–158. Gerecke R (2009) Revisional studies on the European species of the water mite genus *Lebertia* Neuman, 1880 (Acari: Hydrachnidia: Lebertiidae). *Abhandlungen der Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung*, 1–144. Gerecke R, Gledhill T, Pešić V, Smit H (2016) Chelicerata: Acari III. In: Gerecke, R. (Ed.), *Süßwasserfauna von Mitteleuropa*, Bd. 7/2–3, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 1– 429. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2689-5>. Glavatović B, Radusinović S (2011) Seizmološke i geološke specifičnosti sliva Skadarskog jezera. *Skadarsko jezero – stanje i perspektive*, Crnogorska Akademija nauka i umjetnosti, Tom I, Podgorica – Skadar. Grabowski M, Jablonska A, Wysocka A, Pešić V (2018) The Obscure History of the Lake Skadar and Its Biota: A Perspective for Future Research. 10.1007/698\_2018\_349. In: Pešić V, Karaman GS, Kostianoy AG (eds) *The Skadar/Shkodra Lake environment*. Springer, Cham Grosser C, Pešić V (2005) First record of *Batracobdelloides moogi* (Hirudinea: Glossiphoniidae) in the Balkans. *Natura Montenegrina*, 4, 29–32. Grosser C, Moritz G, Pešić V. (2007) *Dina minuocolata* sp. nov. (Hirudinea: Erpobdellidae) – eine neue Egelart aus Montenegro. *Lauterbornia*, 59, pp. 7–18. Grosser C, Pešić V, Gligorović B (2015a) A checklist of the leeches (Annelida: Hirudinea) of Montenegro. *Ecologica Montenegrina* 2 (1): 20–28. <https://doi.org/10.37828/em.2015.2.2> Grosser C, Pešić V, Lazarević P (2015b) A checklist of the



leeches (Annelida: Hirudinida) of Serbia, with new records. *Fauna Balkana* 3: 71-86. Grosser C, Pešić V, Berlajolli V, Gligorović B (2016) *Glossiphonia balcanica* n. sp. and *Dina prokletijaca* n. sp. (Hirudinida: Glossiphoniidae, Erpobdellidae) - two new leeches from Montenegro and Kosovo. *Ecologica Montenegrina* 8: 17-26. <https://doi.org/10.37828/em.2016.8.2> Elbrecht V, Vamos EE, Meissner K, Aroviita J, Leese F (2017) Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. *Methods Ecol Evol.* 8:1265–75 Emerson BC, Hewitt GM (2005) Phylogeography. *Current Biology* 15, 367-371. Hall T (1999) A BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98. Hall B G (2007) *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual*, Third Edition. Sinauer Associates Inc, Sunderland, str.173. Harding RM (1996) New phylogenies: An introductory look at the coalescent. V: New uses for new phylogenies. Harvey P.H. in *sod.* (ur.) New York Oxford Inversity press: 15-22 <https://doi.org/0.1007/s00027-010-0135-x> Hebert P (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences.* 270:S596–S599 Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17 (8): 754-755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754> Ivanova NV, de Waard JR, Hebert PDN (2007) CCDB protocols, glass fiber plate DNA extraction. [ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB\\_DNA\\_Extraction.pdf](http://ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB_DNA_Extraction.pdf) Ivanova NV, Grainger CM (2007a) CCDB protocols, COI amplification. [ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB\\_Amplification.pdf](http://ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB_Amplification.pdf) Ivanova NV, Grainger CM (2007b) CCDB protocols, sequencing. [ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB\\_Sequencing.pdf](http://ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB_Sequencing.pdf) Jabłońska A, Mamos T, Zawal A, Grabowski M (2018) Morphological and molecular evidence for a new shrimp species, *Atyaephyra vladoi* sp. nov. (Decapoda, Atyidae) in the ancient Skadar Lake system, Balkan Peninsula – its evolutionary relationships and demographic history. *Zool Anz.* [https://doi.org/10.1007/698\\_2018\\_349](https://doi.org/10.1007/698_2018_349) Jovanović M, Haring E, Sattmann H, Grosser C, Pešić V (2021) DNA barcoding for species delimitation of the freshwater leech genus *Glossiphonia* from the Western Balkan (Hirudinea, Glossiphoniidae). *Biodiversity Data Journal* 9: e66347. <https://doi.org/10.3897/BDJ.9.e66347> Jueg U (2013) Rote Liste der gefährdeten Egel und Krebssegel Mecklenburg – Vorpommerns, 1. Fassung. Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und Verbraucherschutz Mecklenburg- Vorpommern. 56 pp Jueg U, Michalik P (2018) Lost and found – Fritz Müller's type material of *Glossiphonia verrucata* (Fr. Müller, 1844) (Hirudinida, Glossiphoniidae) with notes on the leech fauna of lake Tegel in Berlin (Germany). *Evolutionary Systematics* 2 (2): 163-168. <https://doi.org/10.3897/evolsyst.2.30793> Kalafatić M (1998) Osnove biološke evolucije. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. Kapli P, Lutteropp S, Zhang J, Kobert K, Pavlidis P, Stamatakis A, Flouri T (2017) Multi-rate Poisson Tree Processes for single-locus species delimitation under Maximum Likelihood and Markov Chain Monte Carlo. *Bioinformatics* 33 (11): 1630-1638. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx025> Karaman G, Nedić D (1981) Zoobenthos of Skadar Lake. In: Beeton AM, Karaman GS (eds) *The biota and limnology of Lake Skadar*. University Veljko Vlahović, Institute of Biological and Medicine Research Titograd, Montenegro, pp 222–246 Kaygorodova IA, Mandzyak NB (2014) Molecular phylogeny of Siberian glossiphoniidae (Hirudinea). *Molecular Biology* 48 (3): 452-455. <https://doi.org/10.1134/s0026893314030091> Kaygorodova I, Bolbat N, Bolbat A (2020) Species delimitation through DNA barcoding of freshwater leeches of the *Glossiphonia* genus (Hirudinea: Glossiphoniidae) from Eastern Siberia, Russia. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 58 (4): 1437-1446. <https://doi.org/10.1111/jzs.12385> Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549. Kutschera U (2012) The *Hirudo medicinalis* species complex. *Naturwissenschaften* 99 (5), pp- 433-434. Kvist S, Oceguera-Figueroa A, Siddall M, Erséus C (2010) Barcoding, types and the *Hirudo* files: Using

information content to critically evaluate the identity of DNA barcodes. *Mitochondrial DNA* 21 (6): 198-205.

<https://doi.org/10.3109/19401736.2010.529905> Kwak HJ, Kim JH, Kim JY. et al. (2021) Behavioral variation according to feeding organ diversification in glossiphoniid leeches (Phylum: Annelida). *Sci Rep* 11, 10940 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90421-1> Light J, Siddall M (1999) Phylogeny of the leech family Glossiphoniidae based on mitochondrial gene sequences and morphological data. *The Journal of Parasitology* 85 (5): 815-823. <https://doi.org/10.2307/3285816> Linder CR, Rieseberg LH (2004) Reconstructing patterns of reticulate evolution in plants. *Am J Bot* 91:1700–1708 Mack J, Kvist S (2019) Improved geographic sampling provides further evidence for the separation of *Glossiphonia complanata* and *Glossiphonia elegans* (Annelida: Clitellata: Glossiphoniidae). *Journal of Natural History* 53: 335-350. <https://doi.org/10.1080/00222933.2019.1590658> Mächler E, Deiner K, Steinmann P, Altermatt F. (2014) Utility of environmental DNA for monitoring rare and indicator macroinvertebrate species. *Freshw Sci.*33:1174–83 Mann K (1962) *Leeches (Hirudinea): their structure, physiology, ecology and embryology (Vol.11)* Pergamon press, New York. Marinković N (2020) *Taksonomska diferencijacija, diverzitet i distribucija vrsta podreda Erpobdelliformes (Annelida; Hirudinea) područja zapadnog Balkana- Taxonomic differentiation, diversity and distribution of species from the suborder Erpobdelliformes (Annelida; Hirudinea) in the western Balkans (Doctoral dissertation, University of Belgrade - Faculty of Biology)*. Martin P (2000) Larval morphology and host-parasite associations of some stream living water mites (Hydrachnidia, Acari). *Archiv Für Hydrobiologie, Supplementband, Monographische Beiträge*, 121 (3–4), 269–320. Martin P (2003) Larval morphology of spring-living water mites (Hydrachnidia, Acari) from the Alps. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 39 (4), 363–393. Martin P (2005) Water mites (Hydrachnidia, Acari) as predators in lotic environments. *Phytophaga*, 307–321. Martin P, Gerecke R (2009) Diptera as hosts of water mite larvae - an interesting relationship with many open questions. *Lauterbornia*, 68, 95–103. Martin P, Dabert M, Dabert J (2010) Molecular evidence for species separation in the water mite *Hygrobatas nigromaculatus* Lebert, 1879 (Acari, Hydrachnidia): evolutionary consequences of the loss of larval parasitism. *Aquatic Science* 72: 347-360. Mau B, Newton M, Larget B (1999) Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics* 55, 1-12. Mehlhorn H (2016) *Animal Parasites*. Springer International Publishing. Merula G (1474) *Bellum Scodrense*. Gabriele di Pietro, Venezia, pp 1–24 Minelli A, Sket B, de Jong Y (2014) Fauna Europaea: Annelida – Hirudinea, incl. Acanthobdellea and Branchiobdellea. *Biodiversity Data Journal* 2: e4015. doi: 10.3897/BDJ.2. e4015. Mitchell R (1970) The evolution of a blind gut in trombiculid mites. *Journal of Natural History*, 4: 22+1–229. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00222937000770211> Mitchell R D (1962) The structure and evolution of water-mite mouthparts. *J. Morph. (Philadelphia)*, 110: 41-59. Montagna M, Mereghetti V, Lencioni V, Rossaro B (2016) Integrated taxonomy and DNA barcoding of alpine midges (Diptera: Chironomidae). *PLoS ONE*,11:e0149673 Moser W, Bowerman J, Hovingh P, Peark A, Ocegüera-Figueroa A (2010) New host and distribution records of the leech *Placobdella sophieae* (Hirudinida: Glossiphoniidae). *Comparative Parasitology*, 81, 199–202. Moser W, Richardson D, Hammond C, Lazo-Wasem E (2012) Molecular characterization of *Glossiphonia elegans* (Verrill, 1872) (Glossiphoniidae: Hirudinida) from its type locality, West River, New Haven County, Connecticut, USA. *Zootaxa* 3195 (1): 287-294. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3195.1.4> Mrazek A (1903) *Ergebnisse einer von Dr. Al. MRAZEK im J[ahr] 1902 nach Montenegro unternommenen Sammelreise vestnik kralovske Ceske Spolecnosti Nauk. Trida matematicko-prirodovedecká [Sitzungsberichte der kgl. Böhm Gesselschaft fer Wissenschaften mathematisch-naturwis-senschaftliche Classe] 1903 (15); 1-24, Taf. 1-4. V Praze [Praha, Prag]*. Musselius A (1912) Einige Hydracarinae aus Montenegro. *Trudy Varšhavskego Obščhestva Estestvoispytatelej*, 23, 95–97. Nesemann H (1997) Egel und Krebsigel (Clitellata: Hirudinea, Branchiobdellida) Österreichs. *Sonderheft der Ersten Vorarlberger Malakologischen*

Gesellschaft, Rankweil, 104 pp. Nesemann H, Neubert E (1999) Süßwasserfauna von Mitteleuropa, Bd. 6, Annelida, 2, Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea; Spektrum Akademischer Verlag, Berlin/Heidelberg, Germany, p 178. Ocegüera-Figueroa A, Phillips AJ, Pacheco-Chaves B, Reeves WK, Siddall M (2011) Phylogeny of macrophagous leeches (Hirudinea, Clitellata) based on molecular data and evaluation of the barcoding locus. *Zoologica Scripta*, 40(2), pp. 194-203. Ocegüera-Figueroa A, León-Règagnon V (2014) Biodiversidad de sanguijuelas (Annelida: Euhirudinea) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 183-189. <https://doi.org/10.7550/rmb.33212> Peláez ML, Valdecasas AG, Martínez D, Horreo JL (2018) Towards unravelling of the slug *A. ater*-*A. rufus* complex (Gastropoda Arionidae): new genetic approaches. *Web Ecol* 18:115–119 Peláez ML, Horreo JL, García-Jiménez R, Valdecasas AG (2022) An evaluation of errors in the mitochondrial COI sequences of Hydrachnidia (Acari, Parasitengona) in public databases. *Exp Appl Acarol. Mar*; 86(3):371-384. doi: 10.1007/s10493-022-00703-0. Epub 2022 Feb 25. PMID: 35212872. Pérez-Flores J, Rueda-Calderon H, Kvist S, Siddall ME, Ocegüera-Figueroa A (2016) From the worm in a bottle of Mezcal: iDNA confirmation of a leech parasitizing the Antillean Manatee. *Journal of Parasitology* 102 (5): 553-555. <https://doi.org/10.1645/16-46> Pešić V (1999) Contribution to the knowledge of Hydracarina (water mites) of Montenegro. *Poljoprivreda i Šumarstvo*, 45 (3–4), 83–96. Pešić V (2001a) A new species of *Nudomideopsis* from Yugoslavia (Acari, Hydrachnellae). *Acta Agriculturae Serbica*, 4, 8 (1999), 73–77. Pešić V (2001b) *Stygohydracarus karanovici* sp. n., and *Atractides inflatipes* Lundblad, 1956, two water mites species (Acari: Hydrachnidia) from (SE Europe). *Zootaxa*, 17, 1–7. Pešić V (2002a) First description of the male of *Atractides graecus* K. Viets, 1950 (Acari, Actinedida, Hygrobatidae) from Montenegro (Yugoslavia). *The Montenegrin Academy of Sciences and Arts, Glasnik of the Section of Natural Sciences*, 14, 177–182. Pešić V (2002b) First records of *Atractides remotus* Szalay, 1953 (Acari, Actinedida, Hygrobatidae) in the Mediterranean region. *Poljoprivreda i šumarstvo*, 47 (3–4), 121–125. Pešić V (2002c) Water mites (Acari, Actinedida) of the stagnant waters from the Skadar lake drainage basin (Crna Gora, Yugoslavia). *Acta Entomologica Serbica*, 2000, 5 (1–2), 131–152. Pešić V (2002d) Two interesting species of the genus *Atractides* Koch 1837 (Acari, Actinedida) from Crna Gora (Ba- 98 PEŠIĆ ET AL. · *Zootaxa* 2586 © 2010 Magnolia Press kan Peninsula). *Lauterbornia*, 44, 65–71. Pešić V (2002e). *Hydrodroma reinhardi* n. sp., a new species of water mites (Acari, Actinedida, Hydrodromidae) from the Mediterranean area. *Aquatic Insects*, 24 (4), 317–325. Pešić V (2003a) New records of water mites (Acari, Hydrachnidia) from Yugoslavia. *Archiv of Biological Sciences, Belgrade*, (2002), 54 (3–4), 25P–26P. Pešić V (2003b) New records of the water mite genera *Atractides* Koch and *Sperchon* Kramer from the Balkan, with the description of one new species. *Zootaxa*, 168, 1–12. Pešić V (2003c) Three water mite species of the genus *Protzia* Piersig (Acari: Hydrachnidia) from the Balkan, with the description of one new species. *Zootaxa*, 216, 1–7. Pešić V, Gerecke R (2003) Water mites of the genera *Albaxona*, *Axonopsis*, *Barbaxonella* and *Erebaxonopsis* (Acari, Hydrachnidia: Aturidae: Axonopsinae) from Central Europe and Mediterranean area. *Archiv für Hydrobiologie*, 139 (4), 563–576. Pešić V (2003f) On some very interesting water mite species (Acari, Actinedida) from Crna Gora (Montenegro), new for the Balkan peninsula and Mediterranean region. *Natura Montenegrina*, 1, 89–98. Pešić V (2003g) New records of water mites (Acari: Hydrachnidia) from running waters from Montenegro and FYR Macedonia (SE Europe). *Acta Entomologica Serbica*, 6 (1–2), 131–128 Pešić V (2004a) Water mites (Acari: Hydrachnidia) of the Biogradska Gora National Park (Serbia and Crna Gora). In: Pešić, V. (Ed), *The Biodiversity of the Biogradska Gora National Park. Monographies I*, Department of Biology, University of Montenegro & Centre for Biodiversity of Montenegro, pp. 65–86. Pešić V (2004b) New records of Halacarid mites (Acari, Halacaroidea) from Crna Gora. In: Pešić, V. (Ed.), *The Biodiversity of the Biogradska Gora National Park. Monographies I*, Department of Biology, University of Montenegro & Centre for Biodiversity of Montenegro, pp.

96–103. Pešić V, Gerecke R, Cîmpean M (2007) Water mites of the genus *Neumania* Lebert (Acari, Hydrachnidia: Unionicolidae: Pionatacinae) in the Mediterranean area. *Annales de Limnologie – International Journal of Limnology*, 43 (3), 187–198. Pešić V, Smit H, Gerecke R, Di Sabatino A. (2010) The water mites (Acari: Hydrachnidia) of the Balkan peninsula, a revised survey with new records and descriptions of five new taxa. *Zootaxa*, 2586, 1–100. Pešić V, Valdecasas A, Garcia-Jimenez R (2012) Simultaneous evidence for a new species of *Torrenticola* Piersig, 1896 (Acari, Hydrachnidia) from Montenegro. *Zootaxa*, 3515, 38–50. Pešić V, Asadi M, Cîmpean M, Dabert M, Esen Y, Gerecke R, Martin P, Savić A, Smit H, Stur E (2017) Six species in one: evidence of cryptic speciation in the *Hygrobat* *fluviatilis* complex (Acariformes, Hydrachnidia, Hygrobatidae). *Systematic & Applied Acarology*, 22, 1327–1377. <https://10.11158/saa.22.9.4> Pešić V, Bańkowska A, Goldschmidt T, Grabowski M, Michoński G, Zawal A (2018a) Supplement to the checklist of water mites (Acari: Hydrachnidia) from the Balkan peninsula. *Zootaxa* 4394(2):151–184 Pešić V, Karaman GS, Kostianoy AG (2018b) Introduction. In: Pešić V, Karaman GS, Kostianoy AG (eds) *The Skadar/Shkodra Lake environment*. Springer, Cham Pešić V, Gadawski P, Gligorović B, Glöer P, Grabowski M, Kovács T, Murányi D, Płóciennik M (2018c) The diversity of the zoobenthos communities of the Lake Skadar/Shkodra basin. In: Pešić V, Karaman GS, Kostianoy AG (eds) *The Skadar/Shkodra Lake environment*. Springer, Cham Pešić V, Broda Ł, Dabert M, Gerecke R, Martin P, Smit H (2019a) Re-established after hundred years: Definition of *Hygrobat* *prosilienis* Koenike, 1915, based on molecular and morphological evidence, and redescription of *H. longipalpis* (Hermann, 1804) (Acariformes, Hydrachnidia, Hygrobatidae). *Systematic and Applied Acarology* 24(8): 1490-1511. <https://dx.doi.org/10.11158/saa.24.8.10> Pešić V, Savić A, Jabłońska A et al. (2019b) Environmental factors affecting water mite assemblages along eucrenon-hypocrenon gradients in Mediterranean karstic springs. *Experimental and Applied Acarology* 77 (4): 471-486. Pešić V, Dmitrović D, Savić A, Milošević Dj, Zawal A, Vukašinović-Pešić V, von Fumetti S (2019c) Application of macroinvertebrate multimetrics as a measure of the impact of anthropogenic modification of spring habitats. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 29: 341-352. Pešić V, Jovanović M, Manović A, Zawal A, Bankowska A, Ljubomirova L, Karaouzas Y, Dabert M (2020a) Molecular evidence for two new species of the *Hygrobat* *fluviatilis* complex from the Balkan Peninsula (Acariformes, Hydrachnidia, Hygrobatidae). *Systematic & Applied Acarology*, 25(9), 1702–1719. Pešić V, Zawal A, Bankowska A, Jovanović M, Dabert M (2020b) A new crenobiontic water mite species of the genus *Atractides* Koch, 1837 from Montenegro and Bulgaria, based on morphological and molecular data (Acariformes, Hydrachnidia, Hygrobatidae). *Systematic & Applied Acarology* 25(10): 1889-1900. Pešić V, Jovanović M, Manović A, Zawal A, Bankowska A, Broda L, Martin P, Dabert M (2020c) Two new species from the *Hygrobat* *nigromaculatus*-complex (Acariformes, Hydrachnidia, Hygrobatidae), based on morphological and molecular evidence. *Acarologia* 60(4): 753-768; DOI 10.24349/acarologia/20204400 Pešić V, Saboori A, Jovanović M, Manović A, Bańkowska A, Zawal A (2020d): *Torrenticola* *dowlingi* sp. nov. a new water mite from Iran based on morphometrical and molecular data (Acariformes, Hydrachnidia, Torrenticolidae), *International Journal of Acarology*, <https://doi.org/10.1080/01647954.2020.1802513> Pešić V, Smit H (2020) *Mideopsis* *milankovici* sp. nov. a new water mite from Montenegro based on morphological and molecular data (Acariformes, Hydrachnidia, Mideopsidae). *Acarologia* 60(3): 566-575. Pešić V, Zawal A, Manović A, Bańkowska A, Jovanović M (2021a) A DNA barcode library for the water mites of Montenegro. *Biodiversity Data Journal* 9: e78311. <https://doi.org/10.3897/BDJ.9.e78311> Pešić V, Smit H, Gülle P, Dabert M (2021b) Molecular DNA barcoding of the water mite genus *Protzia* Persig, 1896 with a description of three new species and the unknown male of *P. longiacetabulata* (Acari, Hydrachnidia). *Systematic & Applied Acarology* 26(7): 1213- 1228. Pešić V (2022) *Sperchon* *milisai* nov. sp., an overlooked new species of water mites (Acari, Hydrachnidia, Sperchontidae) from Montenegro and Croatia, based

on morphological and DNA barcode evidence. *Ecologica Montenegrina*. 51. 81-92. 10.37828/em.2022.51.9. Pfeiffer I, Brenig B, Kutschera U (2004) The occurrence of an Australian leech species (genus *Helobdella*) in German freshwater habitats as revealed by mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33, 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.04.010> Puillandre N, Brouillet S, Achaz G (2021) ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources* 21 (2): 609-620. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281> Radojičić B (2005) The waters of Montenegro. Faculty of Philosophy, Institute of Geography, Nikšić Radulović MM, Radulović M, Stevanović Z, Sekulić G, Radulović V, Burić M, Novaković D, Vako E, Blagojević M, Dević N, Radojević D (2015) Hydrogeology of the Skadar Lake basin (Southeast Dinarides) with an assessment of considerable subterranean inflow. *Environ Earth Sci* 74:71–82 Radulović MM (2018) Hydrogeology of the Skadar Lake basin. In: Pešić V, Karaman GS, Kostianoy AG (eds) *The Skadar/Shkodra Lake environment*. Springer, Cham Radulović V (1983) Palaeographical evolution of Skadar Lake catchment area (in Serbian). In: Ivanović B (ed) *Skadar Lake, Book 9 of Scientific meetings*. Montenegrin Academy of Sciences and Arts, Titograd, pp 13–23 Radulović V (1997) The waters of the Lake Skadar and its neighbouring aquifers as a water supplying sources. In: Mijušković M (ed) *Natural values and protection of Lake Skadar*, vol 44. CANU, Scientific Meeting, pp 39–65 Ratnasingham S, Hebert P (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, 7(3), 355-364. Ratnasingham S, Hebert P (2013) A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system. *PloS one*, 8(7), p.e66213. Remy P (1937) *Sangsues de Yougoslavie*. *Bulletin de la Société zoologique de France*, 62, 140– 148. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres D, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard M, Huelsenbeck J (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61 (3): 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029> Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 34: 3299-3302. DOI: 10.1093/molbev/msx248 Rambaut A, Drummond AJ (2009) Tracer v.1.5. [Online]. Rambaut A (2012) *Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology: FigTree* [Online]. Šapkarev J (1984) *Katalog faune pijavica Crne Gore*. *Glasnik odjeljenja prirodnih nauka Crnogorske Akademije nauka i umjetnosti*, 4, 183–190. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4 (4): 406-25. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454> Sawyer RT (1986) *Leech biology and behaviour* Vol. 1: 1-418. Oxford: Clarendon Press Scoracka A, Magalhaes S, Rector BG, Kuczynski L (2015) Cryptic speciation in the Acari: a function of species lifestyles or our ability to separate species? *Exp Appl Acarol* 67:165– 182 Schmidt U (1935) Beiträge zur Anatomie und Histologie der Hydracarinae, besonders von *Diplodontus despiciens* O. F. MÜLLER. *Z. Morphol. Ökol. Tiere*, 30: 99-176. Siddall M, Budinoff R, Borda E (2005) Phylogenetic evaluation of systematics and biogeography of the leech family Glossiphoniidae. *Invertebrate Systematics* 19 (2). <https://doi.org/10.1071/is04034> Siddall M, Bowerman J (2006) A new species of glossiphoniid leech from *Rana pretiosa* (Amphibia: Ranidae) in Oregon. *Journal of Parasitology*, 92, 855–857. 10.1645/GE-778R.1 - DOI - PubMed Sket B (1968) K poznavanju favne pijavk (Hirudinea) v Jugoslaviji [Zur Kenntnis der Egelfauna (Hirudinea) Jugoslawiens]. *Academia Scientiarum et Artium Slovenica Classis IV: Historia Naturalis et Medicina Diss. Ljubljana* 9 (4): 127-197. Sket B, Trontelj P (2008) Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 129-137. DOI: 10.1007/s10750-007-9010-8 Smit H (2020) *Water mites of the world, with keys to the families, subfamilies genera and subgenera (Acari: Hydrachnidia)*. *Monografieën van de Nederlandse Entomologische Vereniging* 12: 1-774. Smit H, Pešić V (2004) New records of the families *Arrenuridae*, *Nudomideopsidae* and *Athienemanniidae* (Acari: Hydrachnidia) from Macedonia and Yugoslavia. *Acta*

Entomologica Serbica, 7 (1–2), 137–146. Smit H (1996) A revision of enigmatic species within European members of the genus *Arrenurus* Dugès (Acari, Hydrachnellae). *Annales de Limnologie*, 32 (3), 137–146. Smit H, Gerecke R, Di Sabatino A (2000) A catalogue of water mites of the superfamily Arrenuroidea (Acari: Actinedida) from the Mediterranean. *Archiv für Hydrobiologie Supplement*, 121 (3/4), 201–267. Smith I M, Cook DR, Smith BP (2001) Water mites (Hydrachnida) and other arachnids. In Thorp J. H. & A. P. Covich (eds), *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates* (2nd edition). Academic Press, San Diego, California, 551–659. Stålstedt J, Bergsten J, Ronquist F (2013) "Forms" of water mites (Acari: Hydrachnida): intraspecific variation or valid species? *Ecology and Evolution* 3: 3415-3435.

<https://dx.doi.org/10.1002/ece3.704> Stryjecki R, Bańkowska A, Gryzińska M, Sarnacka E, Rutkowska M, Zawal A (2016) The use of molecular techniques in the taxonomy of water mites (Hydrachnida, Acari). *Acta Biologica*, 23: 117–126. DOI: <https://doi.org/10.18276/ab.2016.23-10>

Swoford DL (2001) PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.0. beta10. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates Sworobowicz L, Grabowski M, Mamos T, Burzyński A, Kilikowska A, Sell J, Wysocka A (2015) Revisiting phylogeography of *Asellus aquaticus* in Europe: insight into cryptic diversity and spatiotemporal diversification. *Freshw Biol* 60:1824–1840 Templeton A R (1998) Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7: 381-397 Thon K (1903) Über die in Montenegro von Dr. Mrazek gesammelten Hydrachniden. Die Königliche Böhmische Gesellschaft der Wissenschaften, Prag. II. Classe, 19, 1–7 Trajanovski S, Albrecht C, Schreiber K, Schultheiß R, Stadler T, Benke M, Wilke T (2010) Testing the spatial and temporal framework of speciation in an ancient lake species flock: the leech genus *Dina* (Hirudinea: Erpobdellidae) in Lake Ohrid. *Biogeosciences* 7 (11): 3387-3402. <https://doi.org/10.5194/bg-7-3387-2010> Utevsky S, Utevsky A, Pešić V (2013) First record of *Glossiphonia nebulosa* (Hirudinida: Glossiphoniidae) from the Skadar Lake in Montenegro. *Lauterbornia* 76: 123-125. Valentini A, Pompanon F, Taberlet P (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trends in ecology & evolution*, 24 (2), pp.110-117. Vamberger M, Trontelj P (2007) *Placobdella costata* (Fr. Müller, 1846) (Hirudinea: Glossiphoniidae), a leech species new for Slovenia. *Natura Sloveniae*, 9(1), 37–42 Viets K (1936) Hydracarinae aus Jugoslavien. (Systematische, ökologische, faunistische und tiergeographische Untersuchungen über die Hydrachnellae und Halacaridae des Süßwassers). *Archiv für Hydrobiologie*, 29, 351–409 Waterton C, Ellis R, Wynne B (2013) *Barcoding nature: shifting cultures of taxonomy in an age of biodiversity loss*. Abingdon: Routledge. Whaley E, Lieberman B (2011) *Phylogenetics: Theory and Practise of Phylogenetic Systematics*, Second Edition, Wiley-Blackwell. Weigand H, Beermann AJ, Čiampor F, Costa FO, Csabai Z, Duarte S, Geiger MF, Grabowski M, Rimet F, Rulik B, Strand M, Szucsich N, Weigand AM, Willassen E, Wyler SA, Bouchez A, Borja A, Čiamporová-Zaovičová Z, Ferreira S, Dijkstra K-DB, Eisendle U, Freyhof J, Gadawski P, Graf W, Haegerbaeumer A, van der Hoorn BB, Japoshvili B, Keresztes L, Keskin E, Leese F, Macher JN, Mamos T, Paz G, Pešić V, Pfannkuchen DM, Pfannkuchen MA, Price BW, Rinkevich B, Teixeira MAL, Várbíró G, Ekrem T (2019) DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. *The Science of the Total Environment* 678: 499-524. Wysocka A, Grabowski M, Sworobowicz L, Mamos T, Burzyński A, Sell J (2014) Origin of the Lake Ohrid gammarid species flock: ancient local phylogenetic lineage diversification. *Journal of Biogeography*, 41: 1758–1768. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jbi.12335> Yu G, Rao D, Matsui M, Yang J (2017) Coalescent-based delimitation outperforms distance- based methods for delineating less divergent species: the case of *Kurixalus odontotarsus* species group. *Scientific Reports* 7 (1): 16124. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16309-1> Zawal A, Jaskuła R (2008) First data for parasitizing on *Sympetrum meridionale* (Selys) by *Arrenurus* (Acari: Hydrachnida) larvae from Montenegro. *Natura*

Montenegrina, 7, 354– 359. Zawal A, Pešić V (2018) The Diversity of Water Mite Assemblages (Acari: Parasitengona: Hydrachnidia) of Lake Skadar/Shkodra and Its Catchment Area. In: Pešić V, Karaman G, Kostianoy A (eds) The Skadar/Shkodra Lake Environment. The Handbook of Environmental Chemistry, vol 80. Springer, Cham, pp 311-323. Zawal A, Bankowska A, Michonski G, Grabowski M, Szlauer-Lukaszewska A, Czernicki T, Stepien E, Płóciennik M, Pešić V (2020) Environmental determinants of water mite (Acari: Hydrachnidia) distribution in the ancient Lake Skadar system. Journal of Great Lakes Research 46: 1090-1098. Web sajтови: Fauna Europea: <https://fauna-eu.org>; datum pristupa: 14.02.2022. 7. PRILOZI & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (\*). Broj Vrsta Thon (1903) Muzelijus (1912) Viets (1936) Ostali autori porodica Lebertidae Thor, 1900 1 *Lebertia bracteata*

**K. Viets, 1925 Gerecke (2009 ) 2 *Lebertia* bulgarensis K. Viets, 1926 Gerecke (2009 ) 3** 46  
***Lebertia***

crenophila K. Viets, 1920 Pešić (2004a) 4 *Lebertia cuneifera* Walter, 1922 Gerecke (2009) 5 *Lebertia fimbriata* Thor, 1899 Pešić et al. (2018a) 6 *Lebertia glabra* Thor, 1897 Pešić (2004) 7 *Lebertia guttata* K. Viets Pešić et al. (2019) 8 *Lebertia inaequalis* (Koch, 1837) \* Bańkowska et al. 2016 9 *Lebertia insignis* Neuman, 1880 10 *Lebertia longiseta* (Bader, 1955) \* Pešić et al. (2018a) 11 *Lebertia maculosa* Koenike, 1902 Pešić (1999) 12 *Lebertia maglioi* Thor, 1907 Gerecke (2009) 13 *Lebertia mediterranea* Gerecke, 2009 \* Pešić et al. (2010) 14 *Lebertia porosa* (Thor, 1900) \* + Bańkowska et al. 2016 15 *Lebertia rivulorum* K.Viets, 1933 Pešić et al. (2018a) & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (\*). Broj Vrsta Thon (1903) Muzelijus (1912) Viets (1936) Ostali autori 16 *Lebertia salebrosa* Pešić et al. Koenike, 1908 (2018a) 17 *Lebertia schechteli* Thor, Pešić et al. 1913 (2018a) 18 *Lebertia selfvei* Walter, 1911 Gerecke (2009) 19 *Lebertia separata* Lundblad, 1930 \* Gerecke (2009) 20 *Lebertia sparsicapillata* Thor, 1905 Gerecke (2009) 21 *Lebertia stigmatifera* Thor, 1900 \* Pešić (1999) 22 *Lebertia variolata* Pešić et al. Gerecke, 2009 (2018a) porodica Oxidae Viets, 1926 23

***Oxus angustipositus* (K. Viets, 1908 ) \* Pešić (2002c) 24 *Oxus longisetus* (Berlese, 1885 ) \* Pešić** 17  
 (2002c) 25 ***Oxus ovalis* (Müller**

, Pešić et al. 1776) \* (2010) 26 *Oxus strigatus* (Müller, 1776) \* Pešić (2002c) 27 *Oxus setosus* (Koenike, Pešić et al. 1898) \* (2018a) porodica Sperchontidae, Thor, 1900 28 *Sperchon brevirostris* Koenike, 1895 \* Pešić (1999) 29 *Sperchon clupeifer* (Piersig, 1896) \* + Pešić et al. (2010) 30 *Sperchon denticulatus* \* Pešić (1999) & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (\*). Broj Vrsta Thon (1903) Muzelijus (1912) Viets (1936) Ostali autori 31 *Sperchon hibernicus* Halbert, 1944 Pešić (1999) 32 *Sperchon hispidus* Koenike, 1895 \* Pešić et al. (2018a) 33 *Sperchon mutilus* Koenike, 1895 Pešić (2004a) 34 *Sperchon squamosus* Kramer, 1879 Pešić (1999) 35 *Sperchon thienemanni* Koenike, 1907 Pešić (2004a) 36 *Sperchon vesnae* Pešić, 2003 Pešić (2003a, 2004a) 37 *Sperchon violaceus* Walter, 1944 Pešić (1999, 2004a) 38 *Sperchonopsis procera* Láška, 1965 Di Sabatino et al. (2009) 39 *Sperchonopsis verrucosa* (Protz, 1896) \* Pešić (1999) porodica Teutoniidae Koenike, 1910 40 *Teutonia cometes* (Koch, 1837) \* Pešić (1999) porodica Torrenticolidae Piersig, 1902 41 *Monatractides madritensis* (K.Viets, 1930) \* Pešić et al.

(2010) 42 *Monatractides stadleri* (Walter, 1924) \* Pešić (1999) 43 *Pseudotorrenticola* Di Sabatino et rhynchota Walter, 1906 al. (2003) 44 *Torrenticola amplexa* (Koenike, 1908) \* Pešić (1999) & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (\*). Broj Vrsta Thon (1903) Muzelijus (1912) Viets (1936) Ostali autori 45 *Torrenticola anomala* (Koch, 1837) Pešić (1999) 46 *Torrenticola barsica* (Szalay, 1933) Pešić (1999) 47 *Torrenticola brevirostris* (Halbert, 1911) Pešić (1999) 48 *Torrenticola dudichi* (Szalay, 1933) Di Sabatino (2003) 49 *Torrenticola eliptica* (Maglio, 1909) Pešić (1999) 50 *Torrenticola laskai* (Di Sabatino, 2009) Pešić (1999) 51

***Torrenticola lukai* Pešić, Valdecasas & Garcia- Jimenez, 2012 Pešić et al**

43

. (2012) 52 *Torrenticola lundbladi* (K. Viets, 1930) Pešić (2004c) 53 *Torrenticola meridionalis* (Di Sabatino & Cicolani, 1990) Di Sabatino (2003) 54 *Torrenticola similis* (K. Viets, 1939) Di Sabatino (2003) 55 *Torrenticola tenuirostris* K. Viets, 1936 Di Sabatino (2003) 56 *Torrenticola ungeri* (Szalay, 1927) Pešić (1999) porodica Limnesiidae Thor, 1900 57 *Limnesia fulgida* Koch, Pešić et al. 1836 \* (2018a) 58 *Limnesia koenikei* Piersig, 1894 Pešić (1999) & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (\*). Broj Vrsta Thon (1903) Muzelijus (1912) Viets (1936) Ostali autori 59 *Limnesia maculata* (Müller, 1776) + Pešić (2002c) 60 *Limnesia undulata* (Müller, 1776) \* + Pešić (2002c, 2004a, b) 61 *Limnesia undulatoides* Pešić et al. (Davids, 1997) \* (2018a) porodica Hygrobatidae Koch, 1842 62 *Hygrobates calliger* Piersig, 1896 \* Pešić et al. (2010) 63 *Hygrobates fluviatilis* (Strøm, 1768) \* + Pešić et al. (2017) 64 *Hygrobates foreli* (Lebert, 1874) Pešić (2003g) 65 *Hygrobates lacrima* Pešić 2020 Pešić et al. (2020b) 66 *Hygrobates limnocrenius* Pešić 2020 \* Pešić et al. (2020b) 67 *Hygrobates longipalpis* (Hermann, 1804) \* + Pešić et al. (2018a) 68 *Hygrobates longiporus* Thor, 1898 Pešić (2002c) 69 *Hygrobates marezaensis* Pešić & Dabert, 2017 Pešić et al. (2017) 70 *Hygrobates mediterraneus* Pešić 2019 \* Pešić et al. (2020c) 71 *Hygrobates nigromaculatus* (Lebert, 1879) \* Pešić et al. (2018a) 72 *Hygrobates norvegicus* (Thor, 1897) Pešić (2003g, 2004a) 73 *Hygrobates setosus* (Besseling, 1942) \* Bańkowska et al. 2016 & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (\*). Broj Vrsta Thon (1903) Muzelijus (1912) Viets (1936) Ostali autori 74 *Atractides anae* Pešić 2020 Pešić et al. (2020a) 75 *Atractides fissus* (Walter, 1927) Pešić (2002d, 2004a) 76 *Atractides fluviatilis* (Szalay, 1929) Pešić (1999) 77 *Atractides fonticulus* (K. Viets, 1920) \* Pešić (2003g) 78 *Atractides giberipalpis* Piersig, 1898 \* Pešić (1999, 2004a) 79 *Atractides graecus* K.Viets, 1950 Pešić (2002a, 2003g) 80 *Atractides inflatipes* Lundblad, 1956, \* Pešić (2001b) 81 *Atractides inflatus* (Walter, 1925) \* Pešić (2003g) 82 *Atractides longisetus* Pešić, 2002 Pešić (2002d, 2003b) 83 *Atractides nodipalpis* (Thor, 1899) \* Pešić (1999) 84 *Atractides oblongus* (Walter, 1944) \* Pešić (2003g) 85 *Atractides orghidani* Motaş & Tanasachi, 1960 Pešić (2003f) 86 *Atractides ovalis* Koenike, 1883 Pešić (1999) 87 *Atractides pennatus* (K. Viets, 1920) \* Pešić (1999) 88 *Atractides protendens* K.O.Viets, 1955 Pešić et al. (2010) 89 *Atractides pumilus* (Szalay, 1946) Pešić (1999) & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (\*). Broj Vrsta Thon (1903) Muzelijus (1912) Viets (1936) Ostali autori 90 *Atractides pygmaeus* (Motaş & Tanasachi, 1948) Pešić (2003f, 2004b) 91 *Atractides remotus* Szalay, 1953 Pešić (2002b) 92 *Atractides robustus* Pešić (1999, (Sokolow, 1940) 2004a) 93 *Atractides spinipes* Koch, 1837 Pešić (2003a) 94 *Atractides tener* Thor, 1899 Pešić (2003g) porodica Unionicolidae Oudemans, 1909 95 *Unionicola aculeata* (Koenike, 1890) \* Pešić (2002c) 96

***Unionicola crassipes* (Müller, 1776 ) \* + Pešić (2002c) 97 *Unionicola gracilipalpis* (K. Viets, 1908 )** 17

\* Pešić (2002c) 98 ***Unionicola minor* (Soar, 1900 )** \* Pešić (2002c) 99 ***Unionicola***



parvipora (Lundblad, 1920) Pešić (2002c) 100 Neumania deltoides (Piersig, 1894) \* + Pešić (2002c) 101 Neumania imitata Koenike, 1908 Pešić (2003g) 102 Neumania limosa (Koch, 1836) \* Pešić (2002c, 2003f) 103 Neumania papillosa (Soar, 1902) Pešić (2002c) 104 Neumania uncinata Walter, 1927 Pešić et al. (2007) & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (\*). Broj Vrsta Thon (1903) Muzelijus (1912) Viets (1936) Ostali autori 105 Neumania vernalis (Müller, 1776) + Pešić (2002c) porodica Pionidae Thor, 1900 106

**Forelia cetrata (Koenike, 1895)** ) Pešić (2002c) 107 **Forelia liliacea (Müller, 1776)** ) \* Pešić (2002c)  
108 **Forelia variegator (Koch, 1837)**

17

) \* Pešić (2002c, 2004a) 109 Piona alpicola (Neuman, 1880) \* Pešić et al. (2018a) 110 Piona carnea (Koch, 1836) + Pešić (2002c) 111 Piona coccinea (Koch, 1836) Bańkowska et al. 2016 112 Piona damkoehleri K.Viets, 1930 Pešić (2002c) 113 Piona disparilis (Koenike, 1895) \* Pešić (2002c) 114 Piona imminuta (Piersig, 1897) \* Pešić (2002c) 115 Piona nodata (Müller, 1776) + Pešić (2002c) 116 Piona pusilla (Neuman, 1875) \* Pešić (2002c) 117 Piona rotundoides (Thor, 1897) \* Pešić et al. (2018a) 118 Piona stjoerdalensis (Thor, 1897) \* Pešić et al. (2018a) 119 Pionopsis lutescens (Hermann, 1804) \* Pešić et al. (2018a) 120 Hydrochoreutes krameri (Piersig, 1896) + Pešić (2002c) & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (\*). Broj Vrsta Thon (1903) Muzelijus (1912) Viets (1936) Ostali autori 121 Tiphys ornatus Koch, 1836 Pešić (2002c) 122 Tiphys torris (Müller, 1776) Pešić (2002c) porodica Aturidae Thor, 1900 123 Arrenurus albator (Müller, 1776) \* Smit & Pešić (2004) 124 Arrenurus bicuspidator Berlese, 1885 Smit & Pešić (2004) 125 Arrenurus claviger (Koenike, 1885) Pešić (2002c) 126 Arrenurus compactus Piersig, 1894 + Smit et al. (2000) 127 Arrenurus cuspidifer Piersig, 1894 \* + Smit et al. (2000) 128 Arrenurus cylindratu cylindratu (Piersig, 1894) Pešić (2002c) 129 Arrenurus globator (Müller, 1776) + Smit et al. (2000) 130 Arrenurus haplurus K. Viets, 1925 Pešić et al. (2010) 131 Arrenurus latigenitalis Lundblad, 1956 Smit & Pešić (2004) 132 Arrenurus maculator (Müller, 1776) + Smit et al. (2000) 133 Arrenurus neumani Piersig, 1895 + Smit et al. (2000) 134 Arrenurus papillator (Müller, 1776) Zawal & Jaskuła (2008a, b) 135 Arrenurus perforatus George, 1881 Smit & Pešić (2004) & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (\*). Broj Vrsta Thon (1903) Muzelijus (1912) Viets (1936) Ostali autori 136 Arrenurus refractariolus Biesiadka, 1978 Smit et al. (2015) 137 Arrenurus sinuator (Müller, 1776) + Smit et al. (2000) 138 Arrenurus stjoerdalensis (Thor, 1899) \* Pešić et al. (2018a) 139 Arrenurus virens Neuman, 1880 + Smit et al. (2000) 140 Brachypoda versicolor (Müller, 1776) + + Pešić et al. (2018a) 141 Parabrachypoda mutila Walter, 1928 \* Pešić et al. (2018a) 142 Hexaxonopsis romijni (K. Viets, 1923) \* Pešić et al. (2018a) 143 Hexaxonopsis serrata (Walter, 1928) \* Pešić et al. (2018a) 144 Mideopsis orbicularis (Müller, 1776) \* Pešić (1999) 145 Mideopsis roztoczensis (Biesiadka and Kowalik, 1979) \* Pešić et al. (2018a) 146 Kongsbergia clypeata Szalay, 1945 \* Pešić (1999) 147 Kongsbergia dentata dentata Walter, 1947 Pešić (2003a, 2004b) 148 Kongsbergia largaiollii (Maglio, 1909) Pešić (2003a, 2004b) 149 Albaxona lundbladi Motaš & Tanasachi, 1947 Pešić (2003g) 150 Axonopsis gracilis (Piersig, 1903) Pešić (2003a, 2004b) & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (\*). Broj Vrsta Thon (1903) Muzelijus (1912) Viets (1936) Ostali autori 151 Axonopsis inferorum Motaš & Tanasachi, 1947 Pešić & Gerecke (2003) 152 Axonopsis serrata Pešić (1999, Walter, 1928 2002c) 153 Ljania bipapillata Thor, Pešić et al. 1898 (2018a) 154 Ljania macilenta Koenike, 1908 Pešić (1999) 155 Woolastookia rotundifrons (K. Viets, 1922) \* Pešić et al. (2010) porodica Athienemanniidae K. Viets,

1922 rod Stygohydracarus K. Viets, 1932 156 Stygohydracarus Pešić (2001b, karanovici (Pešić, 2001) 2004a) 157 Stygohydracarus subterraneus Walter, 1947 Smit & Pešić (2004) 158 Stygohydracarus troglobius K. Viets, 1932 Pešić (1999) porodica Eylaidae Leach, 1815 159 Eylais degenerata Koenike, 1897 \* + Pešić (2002c) 160 Eylais planipons Walter, Pešić et al. 1924 \* (2018a) porodica Hydrachnidae Leach, 1815 161 Hydrachna globosa (De Geer, 1778) Pešić (2002c) porodica Hydrodromidae K. Viets, 1936 & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (\*). Broj Vrsta Thon (1903) Muzelijus (1912) Viets (1936) Ostali autori 162 Hydrodroma despiciens (Müller, 1776) + + Pešić (2002c, 2004a) 163 Hydrodroma pilosa Pešić (2002c, Besseling, 1940 2003f) 164

**Hydrodroma reinhardi Pešić, 2002 \* Pešić** (2002e) 165 **Hydrodroma torrenticola (Walter, 1908) \***  
**Pešić**

14

(1999) porodica Hydryphantidae Piersig, 1896 166 Hydryphantes dispar (Schaub, 1888) \* Pešić et al. (2010) 167 Hydryphantes planus Thon, 1899 \* Gerecke (1996) 168 Panisus michaeli Koenike, 1896 Pešić (2003a, 2004a) 169 Panisus torrenticolus Piersig, 1898 \* Pešić (2004a) 170 Parathyas barbiger (K. Viets) Gerecke (1996) 171 Trichothyas jadrankae Pešić 2018 \* Pešić et al. (2018a) 172 Partnunia naprintua Gerecke, 1996 Gerecke (1996) 173 Partnunia puritana Gerecke, 1996 Gerecke (1996) 174 Protzia eximia (Protz, 1896) \* Gerecke (1996) 175 Protzia halberti (Walter, 1920) \* Pešić (2003c) 176 Protzia invalvaris Piersig, 1898 Gerecke (1996) 177 Protzia pachygnatha K. Viets, 1930 Bańkowska et al. 2016 & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (\*). Broj Vrsta Thon (1903) Muzelijus (1912) Viets (1936) Ostali autori 178 Protzia rotunda Walter, 1908 \* Pešić (2004a) 179 Protzia rugosa Walter, 1918 Pešić (2003a, 2004a) 180

**Protzia squamosa paucipora (K. Viets, 1955** ) Gerecke (1996) 181 **Protzia squamosa squamosa**  
**Walter, 1908**

40

Pešić (2004a) 182 Tartarothyas micrommata K. Viets, 1934 \* + Gerecke (1996) 183 Tartarothyas romanica Husiatinschi, 19371 Pešić (2004c) 184 Wandesia thori Schecthel, 1912 Pešić (2003g, 2004a) porodica Rutripalpidae Sokolow, 1934 185 Rutripalpis limicola Sokolow, 1934 Gerecke & Tuzovskij (2001) porodica Acherontacaridae Cook, 1967 186 Acherontacarus fonticulus K. Viets, 1934 + Gerecke & Benfatti (2005) porodica Limnocharidae Grube, 1859 187 Limnochaeres aquatica (Linnaeus, 1758)\* Pešić (1999) porodica Hydrovolziidae Thor, 1905 188 Hydrovolzia placophora (Monti, 1905) Pešić (2003g) & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (\*). Broj Vrsta Thon (1903) Muzelijus (1912) Viets (1936) Ostali autori porodica Pontarachnidae Koenike, 1910 189 Litarachna communis Pešić et al. Walter, 1925 (2010) porodica Feltridae K. Viets, 1926 190 Feltria armata Koenike, Pešić et al. 1902 (2010) 191 Feltria cornuta Pešić (1999, paucipora Szalay, 1946 2004a) 192 Feltria rouxi Walter, Pešić et al. 1907 \* (2010) 193 Feltria rubra Piercig, 1898 Pešić (1999) 194 Feltria zschokkei Pešić (1999, Koenike, 1896 2004a) porodica Frontipodopsidae (K. Viets, 1931) 195 Frontipodopsis reticulatifrons Szalay, 1945 Pešić (1999, 2004b) porodica Letaxonidae Cook, Smith & Harvey, 2000 196 Lethaxona pygmea K. Viets, 1932 \* + Pešić et al. (2010) porodica Momoniidae K. Viets, 1926 197 Stygomomonium latipes Pešić (1999, latipes Szalay, 1932 2004b) porodica Nudomideopsidae Smith, 1990 198

Nudomideopsis latipalpis (E. Angelier, 1963) Pešić (2001a) & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (\*). Broj Vrsta Thon (1903) Muzelijus (1912) Viets (1936) Ostali autori porodica Neocaridae Motaš & Tanasachi, 1947 199 Neocarus hibernicus Halbert, 1944 Pešić (1999) porodica Athienemanniidae K. Viets, 1922 200 Mundamella germanica K. Viets, 1913 Pešić (2003g) Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najrodnijim barkodom u BOLD bazi. Operativna taksonomska jedinica ID ID jedinke BOLD ID BIN Lokalitet Taksonomska oznaka i procenat genetske sličnosti s najrodnijom sekvencom u BOLD bazi Koordinate

**Limnocharidae Limnochaes aquatica 31. CG2020\_6\_C10 DNAEC032-20 BOLD:ACS0438 Podgorica** ,

3

Rijeka **Zeta, Pričelje**

Limnochaes aquatica 100.00

**42.5022N, 19.2225E Hydryphantidae Panisus michaeli CCDB 38361 A04**

3

CCDB 38361 A05 CCDB 38361 A06 DCDDJ004-21 DCDDJ005-21 DCDDJ006-21 BOLD:ADT7504 Kolašin, Lalevića Dolovi, izvor #1 Kolašin, Lalevića Dolovi, izvor #1 Kolašin, Lalevića Dolovi, izvor #1 Panisus michaeli 99.84 Panisus michaeli 99.84 Panisus michaeli 99.83

**42.899N, 19.631E 42.899N, 19.631E 42.899N, 19.631E Trichothyas jadrankae CCDB-38679-A08**

5

**DNCBD008-20 BOLD:AEF1286 Bar, Poseljanski** izvor, **Poseljani**

Hydryphantes sp. 85.56

**42.3095N, 19.0518E Partunia naprintua CCDB 38361 A08 DCDDJ008-21 BOLD:AEL6734 Andrijevic** ,

3

izvor **Trešnjevik**

Partunia cf. steinmanni A LB- 2019 90.05 42.7392N, 19.6933E Protzia invalvaris CCDB 38361 C11 CCDB38233 A08 CCDB38233 A09 CCDB38233 A10 DCDDJ035-21 DCCDB008-21 DCCDB009-21 DCCDB010-21 BOLD:AEI2833 Kolašin, potok Bistrica Kolašin, Kolašinska rijeka Kolašin, Kolašinska rijeka Kolašin, Kolašinska rijeka Protzia invalvaris 99.19 Protzia invalvaris 99.69 Protzia invalvaris 99.39 Protzia invalvaris 99.69

**42.8054N, 19.4456E 42.8391N, 19.5749E 42.8391N, 19.5749E 42.8391N, 19.5749E Protzia squamosa paucipora CCDB 38361 A09**

3

CCDB 38361 A10 CCDB 38361 A11 DCDDJ009-21 DCDDJ010-21 DCDDJ011-21 BOLD:AEL1015 Kolašin, izvor na putu za Trešnjevik Kolašin, izvor na putu za Trešnjevik Kolašin, izvor na putu za Trešnjevik Protzia squamosa 100.00 Protzia squamosa 100.00 Protzia squamosa 100.00

**42.7405N, 19.6801E 42.7405N, 19.6801E 42.7405N, 19.6801E**

3

Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsrodnijim barkodom u BOLD bazi. Protzia octopora CCDB38233 D09 DCCDB045-21 BOLD:AEI5747 Mojkovac, rijeka Bistrica Hydryphantes sp. 83.77 42.9871N, 19.4338E Protzia halberti Hyd\_MN\_VP7 3. CG2020\_8\_2 4. CG2020\_1 5. CG2020\_1\_3 DNAEC081-20 DNAEC002-20 DNAEC003-20 DNAEC004-20 BOLD:AED9646 Bijelo Polje, Lještanica potok Bijelo Polje, Lještanica potok Bijelo Polje, Lještanica potok Bijelo Polje, Lještanica potok Protzia halberti 98.23 Protzia halberti 100.00 Protzia halberti Protzia halberti 100.00

**43.0631N, 19.5808E 43.0631N, 19.5808E 43.0631N, 19.5808E 43.0631N, 19.5808E Protzia rotunda 6. M18\_01\_1\_D10**

3

CCDB-3867-E04 CCDB-3867-E05 DNAEC045-20 DNCBD052-20 DNCBD053-20 BOLD:AED8976 Žabljak, Sedlo, izvor Studenac Bar, Međurječka rijeka potok Bar, Međurječka rijeka potok Protzia rotunda 100.00 Protzia rotunda 100.00 Protzia rotunda 98.31

**43.0973N, 19.0702E 42.0363N, 19.2179E 42.0363N, 19.2179E**

3

Protzia rugosa 6. CG2020\_1\_4 7. CG2020\_8 B6 CCDB38233 D05 DNAEC005-20 DNAEC017-20 DCCDB041-21 BOLD:AEE0170 Bijelo Polje, Lještanica potok Berane, izvor kod man. Đurđevi stupovi Mojkovac, rijeka Bistrica Protzia rugosa 100.00 Protzia rugosa 99.84 Protzia rugosa 100.00

**43.0631N, 19.5808E 42.8527N, 19.862E 42.9871N, 19.4338E Hydrodromidae Hydrodroma reinhardi CCDB-3867-G04 DNCBD076-20 BOLD:AEF0798 Podgorica , rijeka Cijevna, Dinoša**

3

Hydrodroma persica 87.76

**42.4057N, 19.3569E Hydrodroma torrenticola CCDB-3867-E06 DNCBD054-20 BOLD:AEF3799 Bar** ,

1

Međurječka **rijeka**

potok Hydrodroma torrenticola 96.12 42.0363N, 19.2179E Lebertiidae Lebertia maglioi CCDB 38361 C09 CCDB-3867-G08 CCDB 38361 C08 CCDB-3867-F10 DCDDJ033-21 DNCBD080-20 DCDDJ032-21 DNCBD070-20 BOLD:ADK0383 Kolašin, potok Bistrica, Crkvine Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša Kolašin, potok Bistrica, Crkvine Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta Lebertia jadrensis 100.00 Lebertia jadrensis 100.00 Lebertia jadrensis 100.00 Lebertia jadrensis 100.00

**42.8054N, 19.4456E 42.4057N, 19.3569E 42.8054N, 19.4456E 42.5542N, 19.1059E**

3

Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najrodnijim barkodom u BOLD bazi.

**Lebertia cuneifera CCDB 38363 A01 SEPTA001-21 BOLD:ADV4392 Nikšić** , izvor "Babino sicelo"

3

**Lebertia**

cuneifera 98.86 42.8043N, 19.2152E Lebertia variolata CCDB-3867-B05 CCDB-3867-B07 CCDB-3867-D03 CCDB-3867-D04 CCDB-3867-D05 CCDB-3867-D06 16. M19\_24\_3\_E7 17. M19\_24\_3\_E8 DNCBD017-20 DNCBD019-20 DNCBD039-20 DNCBD040-20 DNCBD041-20 DNCBD042-20 DNAEC054-20 DNAEC055-20 BOLD:ADK0996 Bar, potok u selu Godinje Bar, potok u selu Godinje Bar, potok Rikavac iznad starog Bara Bar, potok Rikavac iznad starog Bara Bar, potok Rikavac iznad starog Bara Bar, potok Rikavac iznad starog Bara Bar, Međurječka rijeka potok Bar, Međurječka rijeka potok Lebertia variolata 100.00 Lebertia variolata 100.00 Lebertia variolata 99.24 Lebertia variolata 100.00 Lebertia variolata 100.00 Lebertia variolata 100.00 Lebertia variolata 99.83 Lebertia variolata 100.00 42.

**2206N, 19.1118E 42.2206N, 19.1118E 42.1001N, 19.1432E 42.1001N, 19.1432E 42.1001N, 19.1432E**

3

**42.1001N, 19.1432E 42.0226N, 19.22E 42.0226N, 19.22E Lebertia natans CCDB38233 F03**

CCDB38233 F04 CCDB-3867-F06 DCCDB063-21 DCCDB064-21 DNCBD066-20 BOLD:AEF5684 Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta Lebertia natans 100.00 Lebertia natans 100.00 Lebertia natans 100.00

**42.5541N, 19.1057E 42.5541N, 19.1057E 42.5542N, 19.1059E**

5

Lebertia glabra CCDB38233 C04 CCDB38233 D03 CCDB38233 D04 DCCDB028-21 DCCDB039-21 DCCDB040-21 BOLD:AEI2925 Kolašin, Kolašinska rijeka Kolašin, potok Bistrica, Crkvine Kolašin, potok Bistrica, Crkvine Lebertia glabra 100.00 Lebertia glabra 99.08 Lebertia glabra 99.85

**42.8391N, 19.5749E 42.9871N, 19.4338E 42.9871N, 19.4338E**

3

CCDB38233 D01 DCCDB037-21 BOLD:ACS0595 Kolašin, potok Bistrica, Crkvine Lebertia glabra 99.85 42.9871N, 19.4338E  
 CCDB38233 D02 DCCDB038-21 Kolašin, potok Bistrica, Crkvine Lebertia glabra 98.62 42.9871N, 19.4338E Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsrodnijim barkodom u BOLD bazi.  
 CCDB38233 C05 DCCDB029-21 BOLD:ACR9598 Kolašin, Kolašinska rijeka Lebertia glabra 99.24

**42.8391N, 19.5749E CCDB-3867-C03 DNCBD027-20 BOLD:AEF5913 Tuzi, Vitoja**

5

, bazen Lebertia inaequalis 100.00 42.324N, 19.3637E Lebertia inaequalis CCDB-3867-B11 CCDB-3867-C02 CCDB 38363 B04 CCDB 38363 B06 CCDB 38363 B10 CCDB 38363 B11 DNCBD023-20 DNCBD026-20 SEPTA016-21 SEPTA018-21 SEPTA022-21 SEPTA023-21 BOLD:ADF6223 Tuzi, Vitoja, bazen Tuzi, Vitoja, bazen Bar, Skadarsko jezero, Murići Bar, Skadarsko jezero, Murići Podgorica, Skadarsko jezero, Donja Plavnica Podgorica, rijeka Gornja Plavnica Lebertia inaequalis 100.00 Lebertia inaequalis 100.00 Lebertia inaequalis 100.00 Lebertia inaequalis 99.85 Lebertia inaequalis 100.00 Lebertia inaequalis 100.00 42.324N, 19.3637E 42.324N, 19.3637E

**42.1637N, 19.2214E 42.1637N, 19.2214E 42.2724N, 19.2007E 42.2889N, 19.2108E**

5

**CCDB-3867-E12 DNCBD060-20 BOLD:AEF2742 Bar** , Međuriječka **rijeka** , potok **Lebertia**

3

inaequalis 100.00

**42.0363N, 19.2179E Lebertia insignis CCDB38233 B12 DCCDB024-21 BOLD:AEB9107 Danilovgrad** , rijeka **1**  
**Zeta, Slap**

Lebertia insignis 100.00

**42.6001N, 19.0656E Lebertia maculosa 32. CG2020\_1\_C11**

3

33. CG2020\_1\_C12 DNAEC033-20 DNAEC034-2 BOLD:AED9197 Bijelo Polje, Lještanica, potok Bijelo Polje, Lještanica, potok  
Lebertia maculosa 100.00 Lebertia maculosa 99.84 43.0631N, 19.5809E

**43.0631N, 19.5809E 1. CG2020\_8** CCDB 38361 H01 **DNAEC001-20** DCDDJ085-21 **BOLD:AED9718**

3

**Berane**

, izvor kod man. Đurđevi stupovi Kolašin, izvor kod man. Morača Lebertia maculosa 98.4 Lebertia maculosa 99.03 42.

**8527N, 19.862E 42.7668N, 19.3906E Lebertia porosa CCDB-3867-G09** CCDB 38363 C10 **DNCBD081-20**

3

SEPTA034-21 **BOLD:ACS0974 Podgorica** , rijeka **Cijevna, Dinoša**

Cetinje, Rijeka Crnojevića Lebertia porosa 99.67 Lebertia porosa 99.84 42.4057N, 19.3569E

**42.3557N, 19.0228E CCDB38233 A01 DCCDB001-21 BOLD:AED4662 Podgorica** , izvor **Mareza**

1

Lebertia porosa 99.36 42.4801N, 19.1822E Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najrodnijim barkodom u BOLD bazi. 7. CG2020\_10 DNAEC006-20 Tuzi, Vitoja izvor Lebertia porosa 100.00 42.3254N, 19.3628E Lebertia reticulata Hyd\_MN\_VP13 Hyd\_MN\_VP14 CCDB 38363 A11 DNAEC086-20 DNAEC087-20 SEPTA011-21 BOLD:ADT9218 Šavnik, izvor potoka Bukovica Šavnik, izvor potoka Bukovica Nikšić, izvor Vukovo Vrelo Lebertia reticulata 99.54 Lebertia reticulata 100.00 Lebertia reticulata 99.54

**43.0589N, 19.1103E 43.0589N, 19.1103E 42.8574N, 18.9426E**

3

Lebertia schechteli 9. CG2020 10. CG2020\_2\_3 DNAEC008-20 DNAEC009-20 BOLD:AED9612 Žabljak, Sedlo, izvor Studenac  
Žabljak, Sedlo, izvor Studenac Lebertia schechteli 100.00 Lebertia schechteli 100.00

**43.0973N, 19.0702E 43.0973N, 19.0702E Oxidae Oxus angustipositus CCDB 38361 C03**

3

CCDB-38679-A11 CCDB 38363 B05 CCDB 38363 B07 DCDDJ027-21 DNCBD011-20 SEPTA017-21 SEPTA019-21  
 BOLD:AEB9099 Ulcinj, Šasko jezero Cetinje, Poseljanski potok, donji dio Bar, Skadarsko jezero, Murići Bar, Skadarsko  
 jezero, Murići Oxus angustipositus 99.27 Oxus angustipositus 99.45 Oxus angustipositus 99.85 Oxus angustipositus 99.85  
 41.9768N, 19.3388E

**42.3057N, 19.0557E 42.1637N, 19.2214E 42.1637N, 19.2214E Teutoniidae Teutonia cometes 33.**

3

**M19\_20\_3\_F11** Hyd\_MN\_VP5 **DNAEC068-20** DNAEC079-20 **BOLD:ACH7884 Podgorica, Mareza**

kanal Danilovgrad, izvor Svinjiška vrela Teutonia cometes 99.84 Teutonia cometes 99.85 42.479N, 19.1813E

**42.6384N, 19.0074E Sperchontidae Sperchon brevirostris CCDB38233 D07 DCCDB043-21 BOLD:ACP6107**

3

Kolašin, potok **Bistrica**

, Crkvine Sperchon brevirostris 99.38

**42.9871N, 19.4338E CCDB38233 D08 DCCDB044-21 BOLD:AED3857** Kolašin, potok **Bistrica**

1

, Crkvine Sperchon brevirostris 100.00

**42.9871N, 19.4338E CCDB38233 A11 DCCDB011-21 Kolašin, Kolašinska rijeka**

1

, potok Sperchon brevirostris 100.00 42.8391N, 19.5749E Sperchon clupeifer

**CCDB-3867-B04 DNCBD016-20 BOLD:ACS1100 Bar** , potok u selu **Godinje Sperchon**

3

clupeifer 99.2 42.2206N, 19.1118E Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine  
 podudarnosti sa najsirodnijim barkodom u BOLD bazi.

**Sperchon hibernicus CCDB-3867-D02 DNCBD038-20 BOLD:AEF3824 Bar** , potok **Rikavac**

3

iznad starog Bara Sperchon hibernicus 93.46



**42.1001N, 19.1432E Sperchon hispidus 12. M19 29A 8\_E3**

5

29. CG2020\_7\_C8C7 DNAEC050-20 DNAEC030-20 BOLD:AED3202 Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž Sperchon hispidus 99.36 Sperchon hispidus 99.36 42.5113N, 19.1982E

**42.5113N, 19.1982E Spechon denticulatus 10. CG2020\_8 B8 DNAEC019-20 BOLD:AED8428 Berane**

5

, izvor kod man. Đurđevi stupovi Spechon violaceus 88.12

**42.8527N, 19.862E Sperchon papillosus 3. M19\_12B\_1\_D7 DNAEC043-20 BOLD:AED2134 Budva** , potok,

3

**Lastva Grbaljska**

Sperchon papillosus 97.72 42.3103N, 18.8138E Sperchon thienemanni Hyd\_MN\_VP4 Hyd\_MN\_VP10 CCDB 38361 A03 CCDB 38363 A02 CCDB 38363 A04 CCDB 38363 A05 DNAEC078-20 DNAEC083-20 DCDDJ003-21 SEPTA002-21 SEPTA004-21 SEPTA005-21 BOLD:ADV4077 Šavnik, Kikov izvor blizu Boana Žabljak, Sedlo, izvor Studenac Kolašin, Lalevića Dolovi, izvor #1 Nikšić, planina Lukavica, izvor Babino Sicelo Nikšić, planina Lukavica, izvor Babino Sicelo Nikšić, planina Lukavica, izvor Babino Sicelo Sperchon thienemanni 100.00 Sperchon thienemanni 100.00 Sperchon thienemanni 98.69 Sperchon thienemanni 100.00 Sperchon thienemanni 100.00 Sperchon thienemanni 100.00

**42.9465N, 19.1893E 43.0972N, 19.0702E 42.899N, 19.631E 42.8043N, 19.2152E 42.8043N, 19.2152E**

5

**42.8043N, 19.2152E Sperchon violaceus Hyd\_MN\_VP8**

27. M19\_16A\_3\_F5 56. CG2020\_1 57. CG2020\_8 58. CG2020 26. M19\_16A\_3\_F4 DNAEC088-20 DNAEC062- DNAEC010-20 DNAEC011-20 DNAEC012-20 DNAEC061-20 BOLD:AAN0076 Žabljak, Mlinski potok Kolašin, Biogradska rijeka Bijelo Polje, Lještanica potok Bijelo Polje, Lještanica potok Bijelo Polje, Lještanica potok Kolašin, Biogradska rijeka Sperchon violaceus 100.00 Sperchon violaceus 99.84 Sperchon violaceus 100.00 Sperchon violaceus 100.00 Sperchon violaceus 99.82 Sperchon violaceus 99.84 43.1494N, 19.0898E 42.8968N, 19.6047E

**43.0631N, 19.5809E 43.0631N, 19.5809E 43.0631N, 19.5809E**

3

42.8968N, 19.6047E Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najrodnijim barkodom u BOLD bazi. 28. M19\_16A\_3\_F6 CCDB38233 D06 CCDB38233 H10 CCDB38233 H11 DNAEC063-20 DCCDB042-21 DCCDB094-21 DCCDB095-21 Kolašin, Biogradska rijeka Mojkovac, rijeka Bistrica Mojkovac, izvor u selu Bistrica Mojkovac, izvor u selu Bistrica Sperchon violaceus 99.84 Sperchon violaceus 100.00 Sperchon violaceus 99.51 Sperchon violaceus 100.00 42.8968N, 19.6047E 42.9871N, 19.4338E 42.9862N, 19.4349E

**42.9862N, 19.4349E Sperchonopsis verrucosa CCDB 38361 B11 DCDDJ023-21 BOLD:AEK8297 Cetinje**

1

, izvor "Smokov vijenac" Sperchonopsis verrucosa 95.17

**42.254N, 18.9902E 46. M19\_16B\_1\_G10 DNAEC040-20 BOLD:ACS9705 Kolašin, Biogradska**

5

rijeka Sperchonopsis verrucosa 99.84

**42.8968N, 19.6047E Torrenticolidae Monatractides madritensis CCDB-3867-G11**

3

44. M19\_12B\_3\_G8 DNCBD083-20 DNAEC075-20 BOLD:AED3803 Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša Budva, Lastva Grbaljska, izvor Monatractides madritensis 99.84 Monatractides madritensis 99.84 42.4057N, 19.3569E

**42.3103N, 18.8138E CCDB-3867-B01 DNCBD013-20 BOLD:AEL3852 Bar**, izvor u selu **Godinje**

3

Monatractides madritensis 99.85 42.2206N, 19.1118E Monatarctides stadleri CCDB38233 C03 45. M19\_129\_3\_G9 DCCDB027-21 DNAEC076-20 BOLD:AED3802 Bar, izvor Rikavac iznad starog Bara Budva, Lastva Grbaljska, potok Monatarctides stadleri 99.68 Monatarctides stadleri 99.67 42.1001N, 19.1432E 42.3103N, 18.8138E Torrenticola amplexa CCDB-3867-F08 CCDB-3867-F09 CCDB38233 G04 DNCBD068-20 DNCBD069-20 DCCDB076-21 BOLD:ACR0665 Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta Torrenticola amplexa 100.00 Torrenticola amplexa 100.00 Torrenticola amplexa 100.00

**42.5542N, 19.1059E 42.5542N, 19.1059E 42.5542N, 19.1059E Torrenticola brevirostris 42. M19\_29A\_5\_G6**

3

CCDB 38363 C12 **DNAEC073-20** SEPTA036-21 **BOLD:AED9586 Danilovgrad**, rijeka **Zeta, Spuž**

Podgorica, rijeka Morača, Podgorica Torrenticola brevirostris 98.73 Torrenticola brevirostris 98.7 42.5113N, 19.1982E

**42.4368N, 19.2559E Torrenticola dudichi CCDB38233 D11 DCCDB047-21 BOLD:AED7520 Mojkovac, Bistrica** 1

potok Torrenticola dudichi 99.84 42.9871N, 19.4338E Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsrodnijim barkodom u BOLD bazi.

**43. M19\_16A\_4\_G7 DNAEC074-20 Kolašin, Biogradska rijeka** 3

, potok Torrenticola dudichi 99.84

**42.8968N, 19.6047E Torrenticola laskai CCDB-3867-G06** CCDB-3867-B10 **DNCBD078-20** DNCBD022-**1**  
20 **BOLD:AEF5471 Podgorica** , rijeka **Cijevna, Dinoša**

Kolašin, rijeka Tara, Mateševo Torrenticola laskai 99.69 Torrenticola laskai 99.69 42.4057N, 19.3569E

**42.7898N, 19.5374E CCDB-3867-E11 DNCBD059-20 BOLD:AED2306 Bar, Međurječka Rijeka** 1

, potok Torrenticola laskai 99.19

**42.0363N, 19.2179E Torrenticola lukai CCDB 38361 C12 DCDDJ036-21 BOLD:ACH9685 Kolašin** , potok **1**  
**Bistrica, Crkvine**

Torrenticola lukai 99.52 42.8054N, 19.4456E Torrenticola meridionalis CCDB 38361 D02 CCDB-3867-G02 CCDB-3867-G01  
CCDB-3867-B09 CCDB-3867-E01 CCDB-3867-E03 DCDDJ038-21 DNCBD074-20 DNCBD073-20 DNCBD021-20 DNCBD049-20  
DNCBD051-20 BOLD:AED7519 Kolašin, potok Bistrica, Crkvine Bar, rijeka Orahovštica Bar, rijeka Orahovštica Kolašin, rijeka  
Drcka, Mateševo Bar, izvor Rikavac iznad starog Bara Bar, izvor Rikavac iznad starog Bara Torrenticola meridionalis 98.82  
Torrenticola meridionalis 99.83 Torrenticola meridionalis 100.00 Torrenticola meridionalis 100.00 Torrenticola meridionalis  
99.68 Torrenticola meridionalis 98.87

**42.8054N, 19.4456E 42.2476N, 19.0798E 42.2476N, 19.0798E 42.7619N, 19.5549E 42.1001N, 19.1432E** 3

**42.1001N, 19.1432E CCDB 38361 D01 DCDDJ037-21 BOLD:AEI3402 Kolašin** , potok **Bistrica, Crkvine**

5

Torrenticola meridionalis 99.68

**42.8054N, 19.4456E CCDB 38361 B08 DCDDJ020-21 Kolašin** , potok **Bistrica, Crkvine**

1

Torrenticola meridionalis 98.87

**42.8054N, 19.4456E CCDB38233 B10 DCCDB022-21 Kolašin, Kolašinska rijeka**

1

, potok Torrenticola meridionalis 98.87

**42.8391N, 19.5749E CCDB38233 D12 DCCDB048-21 Mojkovac** , potok **Bistrica**

1

Torrenticola meridionalis 99.68

**42.9871N, 19.4338E Torrenticola similis CCDB 38361 B09 DCDDJ021-21 BOLD:AEK9661 Kolašin** , potok **Bistrica, Crkvine**

1

Torrenticola sp. 90.03

**42.8054N, 19.4456E Torrenticola barsica CCDB-3867-E09 DNCBD057-20 BOLD:AEF1219 Bar, Međurječka rijeka**

1

, potok Torrenticola barsica 100.00 42.0363N, 19.2179E Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsirođnijim barkodom u BOLD bazi.

**CCDB-3867-F04 DNCBD064-20 Bar, Međurječka rijeka** , potok Torrenticola barsica **42.0363N, 19.2179E**  
100.00 **Torrenticola elliptica CDB38233 B11 DCCDB023-21 BOLD:AEI9183 Kolašin, Kolašinska rijeka**

1

, potok Torrenticola elliptica 92.35

**42.8391N, 19.5749E Torrenticola ungeri 19. M19\_24\_6\_E10**

5

20. M19\_24\_6\_E11 CCDB-3867-D08 CCDB-3867-G07 DNAEC057-20 DNAEC058-20 DNCBD044-20 DNCBD079-20

BOLD:AED2307 Bar, Međurječka rijeka, potok Bar, Međurječka rijeka, potok Bar, izvor Rikavac iznad starog Bara Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša Torrenticola ungeri 100.00 Torrenticola ungeri 100.00 Torrenticola ungeri 100.00 Torrenticola ungeri 100.00

**42.0226N, 19.22E 42.0226N, 19.22E 42 .1001N, 19**

5

.1432E

**42.4057N, 19.3569E Pseudotorrenticola rhynchota CCDB-3867-B02 CCDB-3867-B03 DNCBD014-20**

1

DNCBD015-20 **BOLD:AEF1632 Bar**, potok u selu **Godinje**

Bar, potok u selu Godinje Pseudotorrenticola rhynchota 100.00 Pseudotorrenticola rhynchota 100.00

**42.2206N, 19.1118E 42.2206N, 19.1118E** Limnesiidae **Limnesia undulata CCDB-3867-C05** CCDB

3

38363 C03 **DNCBD029-20** SEPTA027-21 **BOLD:AAX5286 Tuzi, Vitoja**

, bazen Tuzi, Skadarsko jezero, Podhum Limnesia undulata 99.85 Limnesia undulata 99.85 42.324N, 19.3637E

**42.3139N, 19.3534E Hygrobatidae Atractides fluviatilis CCDB-3867-G10 DNCBD082-20 BOLD:AEF1143**

5

**Podgorica**, Rijeka **Cijevna, Dinoša Atractides fissus**

80.63

**42.4057N, 19.3569E Atractides fissus CCDB38233 B03** CCDB38233 D10 **DCCDB015-21** DCCDB046-

1

21 **BOLD:AEI1811 Kolašin, Kolašinska rijeka**

, potok Mojkovac, Bistrica potok *Atractides fissus* 97.06 *Atractides fissus* 97.06 42.8391N, 19.5749E

**42.9871N, 19.4338E *Atractides anae* 1. CG2020\_8 B3 DNAEC014-20 BOLD:AED1201 Berane**

1

, izvor kod man. Đurđevi stupovi *Atractides pennatus* 94.22

**42.8527N, 19.862E *Atractides inflatipalpis* 29. M19\_24\_4\_F7 DNAEC064-20 BOLD:AED3549 Bar, Međurječka rijeka**

5

, potok *Atractides hyrcaniensis* 92.08

**42.0226N, 19.22E *Atractides inflatipes* CCDB-3867-G03 DNCBD075-20 BOLD:AEF1144 Bar, Orahovštica**

3

potok ***Atractides***

latipes 80.14 42.2476N, 19.0798E Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsirodnijim barkodom u BOLD bazi.

***Atractides fonticolus* CCDB38233 B09** CCDB38233 B08 **DCCDB021-21** DCCDB020-21

3

**BOLD:AEI8720 Podgorica, Pričelje**, izvor **Studenac**

Podgorica, Pričelje, izvor Studenac *Atractides fonticolus* 96.32 *Atractides fonticolus* 96.32

**42.4835N, 19.2429E 42.4835N, 19.2429E *Atractides gibberipalpis* CCDB 38361 C07 DCDDJ031-21**

3

**BOLD:AEK7766** Kolašin, potok **Bistrica**

, Crkvine *Atractides gibberipalpis* 92.83

**42.8054N, 19.4456E CCDB38233 B02 DCCDB014-21 BOLD:AEI3946 Kolašin, Kolašinska rijeka**

1

, potok *Atractides gibberipalpis* 95.37

**42.8391N, 19.5749E Atractides inflatus 14. M19\_12\_4\_E5 DNAEC052-20 BOLD:ACB4677 Budva, Lastva**

5

**Grbaljska**, izvor **Atractides**

sp. At3 93.99 42.3103N, 18.8138E Atractides nodipalpis CCDB-3867-F07 41. M19\_29A\_1\_G5 DNCBD067-20 DNAEC072-20 BOLD:ACR0209 Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž Atractides nodipalpis 98.06 Atractides nodipalpis 94.46 42.5542N, 19.1059E 42.5113N, 19.1982E CCDB-3867-F05 40. M19\_29A\_1\_G4 DNCBD065-20 DNAEC071-20 BOLD:AED3547 Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž Atractides nodipalpis 94.35 Atractides nodipalpis 94.31 42.5542N, 19.1059E 42.5113N, 19.1982E Atractides pennatus CCDB-3867-F11 CCDB-38679-A09 25. CG2020\_9\_C6 23. CG2020\_9\_C5 3. CG2020\_2 B4 32. M19\_23\_1\_F10 31. M19\_23\_1\_F9 4. M19\_22\_1 D8 DNCBD071-20 DNCBD009-20 DNAEC028-20 DNAEC027-20 DNAEC015-20 DNAEC067-20 DNAEC066-20 DNAEC042-20 BOLD:ADF7007 Bar, potok Orahovštica Bar, Poseljani, Poseljanski potok Podgorica, Mareza izvor Podgorica, Mareza izvor Žabljak, Sedlo, izvor Studenac Nikšić, Vidrovan, izvor Vukovo vrelo Nikšić, Vidrovan, izvor Vukovo vrelo Nikšić, izvor u selu Miločani Atractides pennatus 100.00 Atractides pennatus 100.00 Atractides pennatus 100.00 Atractides pennatus 100.00 Atractides pennatus 99.32 Atractides pennatus 100.00 Atractides pennatus 100.00 Atractides pennatus 100.00 42.2476N, 19.0798E 42.3057N, 19.0557E 42.4801N, 19.1821E 42.4801N, 19.1821E 43.0973N, 19.0702E 42.8575N, 18.9414E 42.8575N, 18.9414E 42.8265N, 18.9018E Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najstrodnijim barkodom u BOLD bazi. CCDB 38363 C01 SEPTA025-21 Budva, izvor "Smokov vijenac" Atractides pennatus 95.22

**42.2346N, 18.907E CCDB 38363 B12 SEPTA024-21 Budva**

1

, izvor "Smokov vijenac" Atractides pennatus 95.22 42.2346N, 18.907E Atractides robustus CCDB-3867-D12 CCDB-3867-D11 CCDB-3867-D10 CCDB 38361 H02 CCDB38233 B01 DNCBD048-20 DNCBD047-20 DNCBD046-20 DCDDJ086-21 DCCDB013-21 BOLD:ADZ9348 Bar, izvor Rikavac iznad starog Bara Bar, izvor Rikavac iznad starog Bara Bar, izvor Rikavac iznad starog Bara Kolašin, izvor kod man. Morača Kolašin, Kolašinska rijeka potok Atractides robustus 94.5 Atractides robustus 95.06 Atractides robustus 99.85 Atractides robustus 100.00 Atractides robustus 96.41 42.1001N, 19.1432E 42.

**1001N, 19.1432E 42.1001N, 19.1432E 42.7668N, 19.3906E 42.8391N, 19.5749E Atractides latipes 18.**

3

**M19\_08B\_7\_E9 DNAEC056-20 BOLD:AED4000 Podgorica**, rijeka **Cijevna, Trgaja**

Atractides inflatipes 42.3964N, 19.3798E Atractides stankovici CCDB38233 C08 CCDB38233 C07 13. CG2020\_4 B10 14. CG2020\_4 B11 DCCDB032-21 DCCDB031-21 DNAEC020-20 DNAEC021-20 BOLD:AED3550 Danilovgrad, rijeka Zeta, Slap Danilovgrad, rijeka Zeta, Slap Podgorica, Mareza kanal Podgorica, Mareza kanal Atractides stankovici 95.68 Atractides

stankovici 95.67 Atractides stankovici 98.61 Atractides stankovici 98.61 42.6001N, 19.0656E 42.6001N, 19.0656E 42.479N, 19.1813E

**42.479N, 19.1813E Hygrobatas calliger CCDB 38361 C06 DCDDJ030-21 BOLD:AEL5782 Kolašin** , potok 1  
**Bistrica**

, Crkvine Hygrobatas calliger 98.94

**42.8054N, 19.4456E CCDB-38679-A04 DNCBD004-20 BOLD:AEF4261 Bar, Poseljanski** potok, **Poseljani** 1

Hygrobatas calliger 99.01

**42.3095N, 19.0518E CCDB-38679-A03 DNCBD003-20 Bar, Poseljanski** potok, **Poseljani** 1

Hygrobatas calliger 99.4

**42.3095N, 19.0518E Hygrobatas foreli Hyd\_MN\_VP6 DNAEC080-20 BOLD:AEE3281 Žabljak, Mlinski potok** 3

Hygrobatas foreli 100.00

**43.1494N, 19.0898E Hygrobatas lacrima 27. CG2020\_3\_C7 DNAEC029-20 BOLD:AED2490 Kolašin** , rijeka 3  
**Tara, Mateševo**

Hygrobatas limnocrenicus 88.04 42.7897N, 19.5383E Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsirodnijim barkodom u BOLD bazi.

**Hygrobatas limnocrenicus 13. M19\_20\_5\_E4 DNAEC051-20 BOLD:AED2489 Podgorica, Mareza** 3

kanal Hygrobatas sp. 3 MJ-2020 99.68/ Hygrobatas limnocrenicus 97.76 42.479N, 19.1813E Hygrobatas longipalpis CCDB-3867-C07 CCDB-3867-C09 CCDB-38679-A10 CCDB 38363 C04 DNCBD031-20 DNCBD033-20 DNCBD010-20 SEPTA028-21 BOLD:ACR9783 Tuzi, Vitoja, bazen Tuzi, Vitoja, bazen Bar, Poseljani, Poseljanski potok Tuzi, Skadarsko jezero, Podhum



Hygrobates longipalpis 100.00 Hygrobates longipalpis 99.68 Hygrobates longipalpis 100.00 Hygrobates longipalpis 42.324N, 19.3637E 42.324N, 19.3637E 42.3057N, 19.0557E

**42.3139N, 19.3534E Hygrobates mediterraneus 7. M19\_24\_2\_D11**

1

8. M19\_24\_2\_D12 36. M19\_24\_1\_G1 CCDB-3867-F01 DNAEC046-20 DNAEC047-20 DNAEC070-20 DNCBD061-20 BOLD:AED2190 Bar, Medjurječka rijeka potok Bar, Medjurječka rijeka potok Bar, Medjurječka rijeka potok Bar, Medjurječka rijeka potok Hygrobates mediterraneus 98.89 Hygrobates mediterraneus 99.83 Hygrobates mediterraneus 100.00 Hygrobates mediterraneus 100.00

**42.0226N, 19.22E 42.0226N, 19.22E 42.0226N, 19.22E 42.0363N, 19.2179E**

5

Hygrobates norvegicus Hyd\_MN\_VP3 CCDB 38361 A01 CCDB 38361 A02 CCDB 38361 A07 DNAEC077-20 DCDDJ001-21 DCDDJ002-21 DCDDJ007-21 BOLD:ACH7323 Šavnik, Kikov izvor, Boan Kolašin, Lalevića Dolovi, izvor #1 Kolašin, Lalevića Dolovi, izvor #1 Kolašin, Lalevića Dolovi, izvor #1 Hygrobates norvegicus 100.00 Hygrobates norvegicus 100.00 Hygrobates norvegicus 100.00 Hygrobates norvegicus 100.00

**42.9465N, 19.1893E 42.899N, 19.631E 42.899N, 19.631E 42.899N, 19.631E Unionicolidae Neumania imitata 15. M19\_29C\_2\_E6 DNAEC053-20 BOLD:AED4073 Danilovgrad , rijeka Zeta, Spuž**

5

Neumania imitata 89.54

**42.5113N, 19.1982E Neumania limosa CCDB-3867-C10 DNCBD034-20 BOLD:AEF5902 Tuzi, Vitoja**

5

, bazen Neumania limosa 100.00 42.324N, 19.3637E Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsirodnijim barkodom u BOLD bazi. CCDB-3867-C01 DNCBD025-20 Tuzi, Vitoja, bazen Neumania limosa 99.39

**42.324N, 19.3637E CCDB38233 G06 DCCDB078-21 Tuzi, Vitoja**

5

, bazen Neumania limosa 100.00 42.324N, 19.3637E Unionicola minor CCDB-3867-G12 CCDB 38361 C02 CCDB 38361 C05 CCDB 38363 B09 DNCBD084-20 DCDDJ026-21 DCDDJ029-21 SEPTA021-21 BOLD:AEF4865 Ulcinj, Šasko jezero Ulcinj, Šasko

jezero Ulcinj, Šasko jezero Tuzi, Vitoja, bazen Unionicola minor 99.69 Unionicola minor 99.65 Unionicola minor 99.82 Unionicola minor 99.82 41.9768N, 19.3389E 41.9768N, 19.3389E 41.9768N, 19.3389E 41.9768N, 19.3389E

**42.324N, 19.3637E CCDB 38361 C04 DCDDJ028-21 BOLD:AAU0335 Ulcinj, Šasko**

5

jezero Unionicola sp. 99.84

**41.9768N, 19.3389E Unionicola ypsilophora CCDB 38363 D04 SEPTA040-21 BOLD:AEN6889 Cetinje** , 3

Rijeka Crnojevića ( **Anodonta exulcerata**

) Unionicola ypsilophora 95.87 42.3546N, 19.0286E Piona damkoehleri CCDB 38361 B03 CCDB 38361 B04 CCDB 38361 B05 CCDB 38361 B06 DCDDJ015-21 DCDDJ016-21 DCDDJ017-21 DCDDJ018-21 BOLD:AEK5107 Danilovgrad, Moromiš bara Danilovgrad, Moromiš bara Danilovgrad, Moromiš bara Danilovgrad, Moromiš bara Piona damkoehleri 99.84 Piona damkoehleri 99.84 Piona damkoehleri 99.66 Piona damkoehleri 99.66

**42.5322N, 19.1993E 42.5322N, 19.1993E 42.5322N, 19.1993E 42.5322N, 19.1993E**

3

CCDB 38361 B07 DCDDJ019-21 Danilovgrad, Moromiš bara Piona damkoehleri 99.68

**42.5322N, 19.1993E Piona laminata CCDB 38361 A12 DCDDJ012-21 BOLD:AEL3248 Danilovgrad, Moromiš** 1

bara Piona nodata 87.18

**42.5322N, 19.1993E Piona disparilis Hyd\_MN\_VP12** CCDB 38363 A08 **DNAEC085-20** SEPTA008-21 3  
**BOLD:AEE3977 Šavnik** , izvor **Bukovica**

, bazen Nikšić, Vukovo Vrelo izvor, bazen Piona disparilis 98.00 Piona disparilis 100.00 43.0589N, 19.1103E

**42.8577N, 18.9416E CCDB 38363 A09 SEPTA009-21 Nikšić, Vukovo Vrelo**

1

izvor, bazen Piona disparilis 100.00

**42.8577N, 18.9416E** Typhis **torris CCDB-3867-C08 DNCBD032-20 BOLD:AEF2208 Tuzi, Vitoja**

3

, bazen Typhis torris 97.53 42.324N, 19.3637E Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najrodnijim barkodom u BOLD bazi. Typhis

**ornatus CCDB 38361 B01** CCDB 38361 B02 **DCDDJ013-21** DCDDJ014-21 **BOLD:ACS0401**  
**Danilovgrad, Moromiš**

3

bara Danilovgrad, Moromiš bara Typhis ornatus 100.00 Typhis ornatus 100.00

**42.5322N, 19.1993E 42.5322N, 19.1993E Wettinidae Wettina lacustris 30. M19\_20\_4\_F8 DNAEC065-20**  
**BOLD:ADL2726 Podgorica, Mareza**

3

kanal Wettina podagrica 98.53

**42.479N, 19.1813E Mideopsidae Mideopsis milankovici 22. M19\_24\_2\_E12 DNAEC059-20 BOLD:AED2191**  
**Bar, Medjurječka rijeka** , potok **42.0226N, 19.22E Mideopsis roztoczensis CCDB-38679-A02**

1

CCDB-3867-G05 CCDB38233 C12 CCDB38233 C11 CCDB 38363 D07 DNCBD002-20 DNCBD077-20 DCCDB036-21 DCCDB035-21 SEPTA043-21 BOLD:ACI1492 Cetinje, Poseljanski izvor Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž Danilovgrad, rijeka Zeta, Vranjske Njive Mideopsis roztoczensis 100.00 Mideopsis roztoczensis 99.85 Mideopsis roztoczensis 100.00 Mideopsis roztoczensis 100.00 Mideopsis roztoczensis 99.85

**42.3095N, 19.0518E 42.4057N, 19.3569E 42.5112N, 19.1991E 42.5112N, 19.1991E 42.4683N, 19.2579E**

3

**Athienemanniidae Mundamella germanica 1. KIA\_20B\_D6 DNAEC041-20 BOLD:AED6269 Danilovgrad, Spuž**

1

, izvor blizu rijeke Zete

**42.5113N, 19.1982E Aturidae Hexaxonopsis serrata CCDB 38363 B01**

1

CCDB 38363 B02 CCDB 38363 B03 SEPTA013-21 SEPTA014-21 SEPTA015-21 BOLD:AEN2897 Bar, Skadarsko jezero, Murići Bar, Skadarsko jezero, Murići Bar, Skadarsko jezero, Murići Hexaxonopsis serrata 99.85 Hexaxonopsis serrata 99.85 Hexaxonopsis serrata 99.69 42.1637N, 19.2214E 42.1637N, 19.2214E

**42.1637N, 19.2214E Parabrachypoda montii 5. M19\_20\_6\_D9 DNAEC044-20 BOLD:AED5455 Podgorica, Mareza**

1

kanal Hydryphantes sp. 80.98

**42.479N, 19.1813E Woolastokia rotundifrons 10. M19\_27\_2\_E1**

1

11.

**M19\_27\_2 \_E2 DNAEC048-20 DNAEC049-20 BOLD:AE0289 Šavnik , rijeka Tušina, Boan**

3

Šavnik, rijeka Tušina, Boan Woolastookia rotundifrons 99.02 Woolastookia rotundifrons 99.35 42.9432N, 19.205E 42.9432N, 19.205E Arrenuridae Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsjrodnijim barkodom u BOLD bazi.

**Arrenurus cylindratus 34. M19\_20\_1\_F12 DNAEC069-20 BOLD:AED6864 Podgorica, Mareza**

3

kanal Arrenurus cylindratus 95.13

**42.479N, 19.1813E Arrenurus refractarioulus CCDB 38363 A07 SEPTA007-21 BOLD:AEN2842 Nikšić**  
 , planina **Lukavica**

3

, bare Arrenurus leucarti 96.47 /A. refractarioulus 96.24 42.8118N, 19.1872E formiranje mreže haplotipova. Podebljanim slovima označeni su haplotipovi koje nose jedinke iz sliva Skadarskog jezera. Naziv vrste Naziv haplotipa COI pristupni brojevi Država

Lokalitet Literatura *Atractides walteri* Hap\_1 MK889691 Austrija NP Gesäuse, Gsengquelle Blattner et al. (2019) *Atractides walteri* Hap\_2 MK889682 Austrija NP Gesäuse, Schieselwaldriedel Blattner et al. (2019) *Atractides walteri* Hap\_3 MK889636; MK889685 Austrija NP Gesäuse, Pichelmayerschütt Blattner et al. (2019) *Atractides walteri* Hap\_4 MK889681; MK889683 Austrija NP Gesäuse, Schieselwaldriedel Blattner et al. (2019) *Atractides separatus* Hap\_5 MK889637; MK889602 Austrija; Njemačka Quellfeld westlich Treffnersee; NP Bayrischer Wald, Albrechtschachten Blattner et al. (2019) *Atractides macrolaminatus/loricatus* grupa Hap\_6 MK889686 Austrija NP Gesäuse, Asseerland, Klauseckbach Blattner et al. (2019) *Atractides brendle* Hap\_7 MK889750; MK889742; MK889741 Njemačka NP Berchtesgaden, Ramsau; NP Berchtesgaden, Klaustal Blattner et al. (2019) *Atractides brendle* Hap\_8 MK889749 Njemačka NP Berchtesgaden, Ramsau Blattner et al. (2019) formiranje mreže haplotipova. Podebljanim slovima označeni su haplotipovi koje nose jedinke iz sliva Skadarskog jezera. *Atractides nodipalpis* Hap\_9 MK889743; Njemačka NP Schwarzwald, Schönmünzach, Herrenwies Blattner et al. (2019) *Atractides nodipalpis* Hap\_10 MK889744 Njemačka NP Schwarzwald, Schönmünzach, Herrenwies Blattner et al. (2019) *Atractides vaginalis* Hap\_11 MK889603; MK889540 Njemačka; Švajcarska Benninger Moos, P0; Stillberg, Dischmatal (GB) Blattner et al. (2019) *Atractides vaginalis* Hap\_12 MK889572 Italija Val Tresenga, Malga Pozzol, Trentino Blattner et al. (2019) *Atractides vaginalis* Hap\_13 MK889543; MK889539; MK889531 Švajcarska Stillberg, Dischmatal (GB); Schwarzenboden, Berner Oberland (BE) Blattner et al. (2019) *Atractides vaginalis* Hap\_14 MK889532 Švajcarska Schwarzenboden, Berner Oberland (BE) Blattner et al. (2019) *Atractides protendens* Hap\_15 MK889645; MK889646 Njemačka NP Berchtesgaden, Klausbach Blattner et al. (2019) *Atractides panniculatus* Hap\_16 MK889653; MK889652; MK889651; MK889650 Njemačka NP Gesäuse, Quelle Mühlbach; NP Berchtesgaden. Klaustal Blattner et al. (2019) *Atractides panniculatus* Hap\_17 MK889649 Njemačka NP Berchtesgaden. Klaustal Blattner et al. (2019) *Atractides gibberipalpis* Hap\_18 MK889727 Njemačka NP Schwarzwald, Schönmünzach Blattner et al. (2019) formiranje mreže haplotipova. Podebljanim slovima označeni su haplotipovi koje nose jedinke iz sliva Skadarskog jezera. *Atractides fonticulus* Hap\_19 MK889711; MK889710; MK889709 Njemačka Bredenber, Bahrenwinkel Blattner et al. (2019) *Atractides fissus* Hap\_20 MK889707; MK889706 Austrija Dürrenstein, Moderbach Blattner et al. (2019) *Atractides mossahebi* Hap\_21 OM321057; OM321065 Iran Mazandaran, potok na putu Chalus-Karaj; mali potok na putu Kondelou Pešić et al. (2022) *Atractides anae* Hap\_22 OL870229 Crna Gora Berane, izvor kod man. Đurđevi stupovi Ova disertacija *Atractides fissus* Hap\_23 OL870148 Crna Gora Kolašin, Kolašinska rijeka Ova disertacija *Atractides fissus* Hap\_24 OL870296 Crna Gora Mojkovac, izvor Bistrica Ova disertacija *Atractides fluviatilis* Hap\_25 OL870211 Crna Gora Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša Ova disertacija *Atractides fonticulus* Hap\_26 OL870291; OL870079 Crna Gora Podgorica, Pričelje, izvor Studenac Ova disertacija *Atractides gibberipalpis* Hap\_27 OL870111 Crna Gora Kolašin, Crkvine, Bistrica Ova disertacija *Atractides gibberipalpis* Hap\_28 OL870115 Crna Gora Kolašin, Kolašinska rijeka Ova disertacija formiranje mreže haplotipova. Podebljanim slovima označeni su haplotipovi koje nose jedinke iz sliva Skadarskog jezera. *Atractides inflatipalpis* Hap\_29 OL870164 Crna Gora Bar, Međurječka rijeka, potok Ova disertacija *Atractides inflatipes* Hap\_30 OL870205 Crna Gora Bar, Orahovštica potok Ova disertacija *Atractides inflatus* Hap\_31 OL870097 Crna Gora Budva, Lastva Grbaljska, izvor Ova disertacija *Atractides latipes* Hap\_32 OL870105 Crna Gora Podgorica, rijeka Cijevna, Trgaja Ova disertacija *Atractides nodipalpis* Hap\_33 OL870084 Crna Gora Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta Ova disertacija *Atractides nodipalpis* Hap\_34 OL870182; OL870145 Crna Gora Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta; Spuž, rijeka Zeta Ova disertacija *Atractides nodipalpis* Hap\_35 OL870210 Crna Gora Spuž, rijeka Zeta Ova disertacija *Atractides pennatus* Hap\_36 OL870283; OL870150; OL870135; OL870285; OL870230; OL870126; OL870206; OL870274; OL870260; Crna Gora Bar: potok Orahovštica,

Poseljanski izvor; Podgorica, Mareza izvor; Nikšić: izvor Vidrovan, selo Miločani; Budva, izvor Smokov vijenac Ova disertacija formiranje mreže haplotipova. Podebljanim slovima označeni su haplotipovi koje nose jedinke iz sliva Skadarskog jezera.

Atractides pennatus Hap\_37 OL870138 Crna Gora Žabljak, Sedlo, izvor Studenac Ova disertacija Atractides robustus Hap\_38 OL870295; OL870178; Crna Gora Kolašin; izvor manastir Morača, Kolašinska rijeka; Ova disertacija Atractides robustus Hap\_39 OL870094 Crna Gora Bar, izvor iznad starog Bara Ova disertacija Atractides robustus Hap\_40 OL870301 Crna Gora Bar, izvor iznad starog Bara Ova disertacija Atractides robustus Hap\_41 OL870212 Crna Gora Bar, izvor iznad starog Bara Ova disertacija Atractides stankovici Hap\_42 OL870245; OL870231; OL870242 Crna Gora Danilovgrad, rijeka Zeta Ova disertacija Atractides stankovici Hap\_43 OL870189 Crna Gora Danilovgrad, rijeka Zeta; Podgorica, Mareza kanal Ova disertacija

mitohondrijskog COI gena, korišćenjem analitičkog alata "Taxon ID tree" dostupnog u BOLD bazi. Porodice vodenih grinja predstavljene su različitim bojama. Za svaku od 232 jedinke prikazan je: naziv vrste, redni broj i ID iz BOLD baze, naziv porodice i BIN. 1. dio mitohondrijskog COI gena, korišćenjem analitičkog alata "Taxon ID tree" dostupnog u BOLD bazi. Porodice vodenih grinja predstavljene su različitim bojama. Za svaku od 232 jedinke prikazan je: naziv vrste, redni broj i ID iz BOLD baze, naziv porodice i BIN. 2. dio mitohondrijskog COI gena, korišćenjem analitičkog alata "Taxon ID tree" dostupnog u BOLD bazi. Porodice vodenih grinja predstavljene su različitim bojama. Za svaku od 232 jedinke prikazan je: naziv vrste, redni broj i ID iz BOLD baze, naziv porodice i BIN. 3. dio mitohondrijskog COI gena, korišćenjem analitičkog alata "Taxon ID tree" dostupnog u BOLD bazi. Porodice vodenih grinja predstavljene su različitim bojama. Za svaku od 232 jedinke prikazan je: naziv vrste, redni broj i ID iz BOLD baze, naziv porodice i BIN. 4. dio mitohondrijskog COI gena, korišćenjem analitičkog alata "Taxon ID tree" dostupnog u BOLD bazi. Porodice vodenih grinja predstavljene su različitim bojama. Za svaku od 232 jedinke prikazan je: naziv vrste, redni broj i ID iz BOLD baze, naziv porodice i BIN. 5. dio mitohondrijskog COI gena, korišćenjem analitičkog alata "Taxon ID tree" dostupnog u BOLD bazi. Porodice vodenih grinja predstavljene su različitim bojama. Za svaku od 232 jedinke prikazan je: naziv vrste, redni broj i ID iz BOLD baze, naziv porodice i BIN. 6. dio 186 | s t r . Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (...) i Hydrachnidia (...) na području sliva Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022. Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (...) i Hydrachnidia (...) na području sliva Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022. Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (...) i Hydrachnidia (...) na području sliva Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022. Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (...) i Hydrachnidia (...) na području sliva Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022. Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (...) i Hydrachnidia (...) na području Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (...) i Hydrachnidia (...) na području Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (...) i Hydrachnidia (...) na području Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (...) i Hydrachnidia (...) na području sliva Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022. Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (...) i Hydrachnidia (...) na području sliva Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022. Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (...) i Hydrachnidia (...) na području sliva Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022. Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (...) i Hydrachnidia (...) na području sliva Skadarskog jezera. Doktorska disertacija, UCG, PMF, Studijski program Biologija, 2022. Jovanović M. Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta



















**sources:**

- 1 835 words / 2% - Internet from 04-Jan-2022 12:00AM  
[bdj.pensoft.net](http://bdj.pensoft.net)

---

- 2 703 words / 2% - Internet from 02-Nov-2021 12:00AM  
[bdj.pensoft.net](http://bdj.pensoft.net)

---

- 3 951 words / 2% - Internet from 02-Feb-2022 12:00AM  
[arpha.pensoft.net](http://arpha.pensoft.net)

---

- 4 666 words / 2% - Internet  
[Lovrenčić, Leona. "Molecular phylogenetic and phylogeographic analysis of populations of \*Holandriana holandrii\* \(C. Pfeiffer, 1828\) \(Mollusca: Gastropoda\) in Croatia", University of Zagreb. Faculty of Science. Department of Biology., 2015](#)

---

- 5 323 words / 1% - Internet from 23-Dec-2021 12:00AM  
[public.pensoft.net](http://public.pensoft.net)

---

- 6 265 words / 1% - Internet  
[Marinković, Nikola. "Taxonomic differentiation, diversity and distribution of species from the suborder Eprobodelliformes \(Annelida; Hirudinea\) in the western Balkans", Универзитет у Београду, Биолошки факултет, 2020](#)

---

- 7 19 words / < 1% match - Internet from 29-Dec-2021 12:00AM  
[bdj.pensoft.net](http://bdj.pensoft.net)

---

- 8 10 words / < 1% match - Internet from 08-Mar-2016 12:00AM  
[bdj.pensoft.net](http://bdj.pensoft.net)

---

- 9 15 words / < 1% match - Internet  
[Tomaš, Tin. "Phylogenetic utility of ribosomal and protein-coding genes for reconstructing the phylogeny of Elmidae \(Coleoptera\)", University of Zagreb. Faculty of Science. Department of Chemistry., 2017](#)

---

- 10 10 words / < 1% match - Internet  
[Kocijan, Kristina. "Molecular phylogenetic and phylogeographic analysis of \*Ancylus fluviatilis\* O. F. Müller, 1774 \(Gastropoda: Planorbidae\) in Croatia", University of Zagreb. Faculty of Science. Department of Biology., 2016](#)

---

- 11 11 words / < 1% match - Internet from 01-Jan-2022 12:00AM  
[public.pensoft.net](http://public.pensoft.net)

---

- 12 20 words / < 1% match - Internet from 31-Aug-2020 12:00AM  
[nardus.mpn.gov.rs](http://nardus.mpn.gov.rs)

- 
- 13 164 words / < 1% match - Internet from 18-Mar-2022 12:00AM  
[www.poslovniforum.hr](http://www.poslovniforum.hr)
- 
- 14 95 words / < 1% match - Internet from 20-May-2022 12:00AM  
[repozitorij.pmf.unizg.hr](http://repozitorij.pmf.unizg.hr)
- 
- 15 34 words / < 1% match - Internet from 12-Apr-2016 12:00AM  
[biotaxa.org](http://biotaxa.org)
- 
- 16 14 words / < 1% match - Internet from 12-Apr-2016 12:00AM  
[biotaxa.org](http://biotaxa.org)
- 
- 17 38 words / < 1% match - Crossref  
[Andrzej Zawal, Vladimir Pešić. "Chapter 257 The Diversity of Water Mite Assemblages \(Acari: Parasitengona: Hydrachnidia\) of Lake Skadar/Shkodra and Its Catchment Area", Springer Nature, 2018](#)
- 
- 18 37 words / < 1% match - Crossref  
[Süßwasserfauna von Mitteleuropa Bd 7/2-3 Chelicerata, 2016.](#)
- 
- 19 25 words / < 1% match - Internet from 26-Jun-2020 12:00AM  
[fedorabg.bg.ac.rs](http://fedorabg.bg.ac.rs)
- 
- 20 10 words / < 1% match - Internet from 01-Oct-2020 12:00AM  
[fedorabg.bg.ac.rs](http://fedorabg.bg.ac.rs)
- 
- 21 23 words / < 1% match - Internet from 24-Jun-2022 12:00AM  
[fedora.ucg.ac.me](http://fedora.ucg.ac.me)
- 
- 22 10 words / < 1% match - Internet from 24-Jun-2022 12:00AM  
[fedora.ucg.ac.me](http://fedora.ucg.ac.me)
- 
- 23 27 words / < 1% match - Internet from 09-Sep-2021 12:00AM  
[canupub.me](http://canupub.me)
- 
- 24 16 words / < 1% match - Internet from 07-Feb-2022 12:00AM  
[link.springer.com](http://link.springer.com)
- 
- 25 11 words / < 1% match - Internet from 04-Apr-2022 12:00AM  
[link.springer.com](http://link.springer.com)
- 
- 26 26 words / < 1% match - Crossref



[Nikola Marinković, Momir Paunović, Maja Raković, Milica Jovanović, Vladimir Pešić. "Chapter 12 Importance of Small Water Bodies for Diversity of Leeches \(Hirudinea\) of Western Balkan", Springer Science and Business Media LLC, 2022](#)

---

27 14 words / < 1% match - Internet from 19-Nov-2020 12:00AM  
[repozitorij.unizg.hr](#)

---

28 10 words / < 1% match - Internet from 02-Jun-2021 12:00AM  
[repozitorij.unizg.hr](#)

---

29 23 words / < 1% match - Internet  
[Blattner, Lucas. "Spring Ecosystems of the Alps: Isolated biodiversity islands with distinctive species assemblages", 2021](#)

---

30 22 words / < 1% match - ProQuest  
[Snjegota, Dragana. "Geneticka struktura i filogeografski položaj vuka \(Canis lupus L. 1758\) Bosne i Hercegovine", University of Novi Sad \(Serbia\), 2020](#)

---

31 21 words / < 1% match - Internet from 30-Apr-2012 12:00AM  
[www.pmcg.co.me](#)

---

32 14 words / < 1% match - Internet from 15-Nov-2015 12:00AM  
[archiv.ub.uni-marburg.de](#)

---

33 14 words / < 1% match - Internet from 31-Jan-2022 12:00AM  
[bioone.org](#)

---

34 14 words / < 1% match - Internet from 11-Dec-2016 12:00AM  
[senat.ucg.ac.me](#)

---

35 13 words / < 1% match - Internet from 18-Jan-2022 12:00AM  
[mapress.com](#)

---

36 13 words / < 1% match - Internet from 27-Dec-2021 12:00AM  
[www.kmae-journal.org](#)

---

37 12 words / < 1% match - Internet from 01-Jan-2021 12:00AM  
["Liste des espèces de sangsues d'eau douce en France", Wikipedia, fr, 2021](#)

---

38 12 words / < 1% match - Internet  
[Beltram, Jasmina. "Identification of a casual gene for leanness within the Fob3b2 locus in mice", J. Beltram, 2020](#)

---

39

12 words / < 1% match - Internet from 23-Jan-2022 12:00AM  
[www.parlament.ba](http://www.parlament.ba)

---

40

11 words / < 1% match - Crossref  
[Reinhard Gerecke, Peter Martin, Terence Gledhill. "Water mites \(Acari: Parasitengona: Hydrachnidia\) as inhabitants of groundwater-influenced habitats - considerations following an update of Limnofauna Europaea", \*Limnologica\*, 2018](#)

---

41

11 words / < 1% match - Internet  
[Abram, Nerilie. "The ocean and cryosphere in a changing climate - this summary for policymakers was formally approved at the second joint session of working groups I and II of the IPCC and accepted by the 51th session of the IPCC, Principality of Monaco, 24th September 2019 : summary for policymakers", IPCC, 2019](#)

---

42

11 words / < 1% match - Internet from 16-Feb-2019 12:00AM  
[www.noviekonomist.info](http://www.noviekonomist.info)

---

43

10 words / < 1% match - Crossref  
[Vladimir Pešić, Alireza Saboori, Milica Jovanović, Ana Manović, Aleksandra Bańkowska, Andrzej Zawal. "sp. nov. a new water mite from Iran based on morphometrical and molecular data \(Acariformes, Hydrachnidia, Torrenticolidae\)", \*International Journal of Acarology\*, 2020](#)

---

44

10 words / < 1% match - Internet from 19-Jan-2022 12:00AM  
[d-nb.info](http://d-nb.info)

---

45

10 words / < 1% match - Internet  
[Théry, Thomas. "Systématique du genre \*Essigella\* \(Hemiptera : Sternorrhyncha\) au moyen de données moléculaires", 2018](#)

---

46

10 words / < 1% match - Internet from 03-Dec-2020 12:00AM  
[pure.uva.nl](http://pure.uva.nl)

---

47

10 words / < 1% match - Internet from 15-Oct-2014 12:00AM  
[www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si](http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si)

---