

UNIVERZITET CRNE GORE
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
STUDIJSKI PROGRAM BIOLOGIJA

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 BIOLOGIJA

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 BIOLOGY

Milica Jovanović

**PHYLOGENY, PHYLOGEOGRAPHY
AND DISTRIBUTION OF
GLOSSIPHONIIDAE (HIRUDINEA)
AND HYDRACHNIDIA (ACARI) IN THE
SKADAR LAKE CATCHMENT AREA**

PHD THESIS

PODGORICA, 2022

PODACI O DOKTORANDU

Ime i prezime:	Milica Jovanović
Datum i mjesto rođenja:	30. 10. 1993. Podgorica
Naziv završenog studijskog programa i godina završetka:	Dvogodišnji magistarski program „Zaštita prirode“ Univerzitet Primorska, Slovenija 17. 9. 2018.
Mentor:	Prof. dr Vladimir Pešić, redovni profesor UCG, Prirodno-matematički fakultet, Studijski program Biologija

Komisija za ocjenu teme

Predsjednik: prof. dr Drago Marić, redovni profesor u penziji, UCG, Prirodno-matematički fakultet, Studijski program Biologija;

Član: prof. dr Danka Caković, redovni profesor, UCG, Prirodno-matematički fakultet, Studijski program Biologija;

Član: prof. dr Vladimir Pešić, redovni profesor, UCG, Prirodno-matematički fakultet, Studijski program Biologija;

Komisija za ocjenu i odbranu doktorske disertacije

Predsjednik: prof. dr Drago Marić, redovni profesor u penziji, UCG, Prirodno-matematički fakultet, Studijski program Biologija;

Član: prof. dr Danka Caković, redovni profesor, UCG, Prirodno-matematički fakultet, Studijski program Biologija;

Član: prof. dr Vladimir Pešić, redovni profesor, UCG, Prirodno-matematički fakultet, Studijski program Biologija;

Član: prof. dr Marko Miliša, vanredni profesor, Sveučilište u Zagrebu, Prirodno-matematički fakultet, Biološki odsjek;

Član: prof. dr Dejan Dmitrović, vanredni profesor, Univerzitet u Banjoj Luci, Prirodno-matematički fakultet;

Datum odbrane: 21. 10. 2022.

PODACI O DOKTORSKOJ DISERTACIJI

NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE: “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 bio zabilježen u slivu Skadarskog jezera. 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:

KEY 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 test the efficiency of 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 of 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 glosiphonid 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:

Zahvalnica

Zahvaljujem mentoru, prof. dr Vladimiru Pešiću na uloženom vremenu i usmjeravanju tokom doktorskih studija.

Zahvalnost upućujem prof. dr Dejanu Dmitroviću, prof. dr Danki Caković, prof. dr Dragu Mariću i prof. dr Marku Miliši, na podršci i sugestijama za unapređenje disertacije.

Zahvaljujem prof. dr Elisabeth Haring i dr Helmut Sattmann, kao i njihovom timu iz Laboratorije za molekularnu sistematiku Prirodnjačkog muzeja u Beču, na gostoprimstvu i posvećenosti tokom boravka u njihovoj ustanovi.

Zahvaljujem prof. dr hab. Michalu Grabowskom, kao i njegovom timu sa Katedre za zoologiju beskičmenjaka i hidrobiologiju Univerziteta u Lođu, na gostoprimstvu i posvećenosti tokom boravka u njihovoj ustanovi.

Zahvalna sam kolegama sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Podgorici koji su mi pružili podršku, uputili značajne sugestije i smjernice tokom doktorskih studija. Posebno cijenim vrijeme provedeno sa kolegicom Anom Manović u lijepoj i produktivnoj atmosferi tokom zajedničkih aktivnosti na projektu „DNA-Eco“.

Zahvalnost upućujem doc. dr Goramu Popivodi, rukovodiocu doktorskih studija na Prirodno-matematičkom fakultetu, na posvećenosti i profesionalizmu.

Zahvalna sam i svojim prijateljima na podršci tokom svih prethodnih godina.

Posebno zahvaljujem svojoj porodici na безусловnoj podršci svim mojim izborima.

U Podgorici, 21. 10. 2022.

Milica Jovanović

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	19
1.4. Opšte karakteristike vodenih grinja Hydrachnidia (Acari, Trombidiformes)	20
1.4.1. Klasifikacija vodenih grinja	20
1.4.2. Životni ciklus	22
1.4.3. Morfološke karakteristike	23
1.4.4. Anatomske karakteristike	25
1.5. Pregled istraživanja faune vodenih grinja u Crnoj Gori	26
1.6. Primjena molekularnih metoda u taksonomiji vodenih grinja	27
1.7. Filogenija	28
1.8. Filogeografija	31
1.9. Ciljevi rada	32
2. MATERIJALI I METODE	34
2.1.1. Područje istraživanja	35
2.1.2. Paleogeografska istraživanja	36
2.1.3. Limnološka istraživanja	37
2.1.4. Filogenetska istraživanja	38
2.2. Uzorkovanje i morfološke analize pijavica	39
2.3. Molekularno-genetičke analize pijavica	42
2.4. Uzorkovanje i morfološke analize vodenih grinja	47
2.5. Molekularno-genetičke analize vodenih grinja	50
2.6. Bioinformatičke analize	53
2.6.1. Bioinformatičke analize pijavica	53
2.6.1.1. Uređivanje i poravnavanje nukleotidnih sekvenci	53

2.6.1.2. Filogenetičke i filogeografske analize.....	54
2.6.1.3. Razdvajanje vrsta.....	55
2.6.1.4. Analize pomoću BOLD platforme.....	55
2.6.2. Bioinformatičke analize vodenih grinja.....	56
2.6.2.1. Uređivanje i poravnavanje nukleotidnih sekvenci.....	56
2.6.2.2. Filogenetičke i filogeografske analize.....	56
2.6.2.3. Analize pomoću BOLD platforme.....	58
3. REZULTATI.....	60
3.1.1. Rezultati morfološke analize pijavica.....	61
3.1.2. Rezultati molekularno-genetičkih analiza pijavica.....	63
3.1.3. Genetičke distance i razdvajanje vrsta pijavica.....	70
3.1.4. Genetička varijabilnost sekvenci pijavica.....	72
3.2.1. Rezultati morfoloških analiza i DNK barkod identifikacije vodenih grinja.....	78
3.2.2. Nove vrste vodenih grinja u fauni Crne Gore i Balkanskog poluostrva.....	79
3.2.3. Distribucija vodenih grinja u slivu Skadarskog jezera.....	83
3.2.4. Filogenetski odnosi vodenih grinja u slivu Skadarskog jezera na osnovu DNK barkodinga.....	85
3.2.5. Filogenetski odnosi vodenih grinja roda <i>Atractides</i>	104
3.2.6. Genetička varijabilnost sekvenci vodenih grinja <i>Atractides</i> Koch, 1837.....	106
4. DISKUSIJA.....	110
4.1. Rezultati morfološke, filogenetičke i filogeografske analize pijavica porodice Glossiphoniidae.....	112
4.2. Rezultati morfološke, filogenetičke i filogeografske analize vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia).....	114
4.3. Otkrivanje kriptičnih i/ili pseudokriptičnih vrsta vodenih grinja.....	116
5. ZAKLJUČCI.....	121
6. LITERATURA.....	124
7. PRILOZI.....	145

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 smješe od 25 μ l.

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 korišćene u filogenetskoj analizi.

Tabela 10: Interspecifične srednje vrijednosti K2P distance analiziranih vrsta pijavica (Glossiphoniidae) (ispod dijagonale) i *p*-distance (iznad dijagonale) sa vrijednostima standardne devijacije.

Tabela 11: Osnovni parametri genetičkog diverziteta populacija pijavica *Glossiphonia*.

Tabela 12: Haplotipovi za *COI* sekvence analiziranih pijavica.

Tabela 13: Haplotipovi za *COI* sekvence analiziranih jedinki *G. complanata*.

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 korišćene u filogenetskoj analizi.

Tabela 16: Osnovni parametri genetičkog diverziteta populacija vodenih grinja roda *Atractides*.

Tabela 17: Haplotipovi za *COI* sekvence analiziranih vodenih grinja *Atractides*.

Tabela 18: Vrste vodenih grinja sa maksimalnom intraspecifičnom distancom (ID) > 2,2%.

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)..... 16
Slika 6. <i>G. balcanica</i> a – dorzalno, b – ventralno, c – prednja pijavka, d – raspored očiju (Dečani, Kosovo) 17
Slika 7. <i>G. pulchella</i> 3 – ventralno, 4 i 5 dorzo-marginalno, m – marginalne, p – paramedijalne bradavice (preuzeto i modifikovano 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 modifikovano iz Martin & Gerecke, 2009)..... 23
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). 24
Slika 12. Pogled sa Bobije na Skadarsko jezero..... 35
Slika 13. Mapa sliva Skadarskog jezera (preuzeto i modifikovano prema Glöer-u u Pešić i ed. 2018 36
Slika 14. Mapa Crne Gore sa označenim lokalitetima u slivu Skadarskog jezera na kojima su sakupljeni uzorci pijavica 39
Slika 15. (lijevo) Karuč, sublakustrični izvor Slika 16. (desno) Crno oko, limnokreni izvor..... 40
Slika 17. Sakupljanje pijavica (slika lijevo – ručno sakupljanje, slika desno i dolje – sakupljanje ručnom mrežicom 40
Slika 18. Mapa šireg područja sa lokalitetima na kojima su sakupljene pijavice 41
Slika 19. Lijevo – pojedinačni vaučer. Slika desno – skladištenje vaučera koji čine zbirku vaučera NHM. 42
Slika 20. Provjera kvaliteta dobijenih PCR produkata pijavica nakon elektroforeze. 46

Slika 21. Mapa Crne Gore sa lokalitetima u slivu Skadarskog jezera na kojima su potvrđeni nalazi vodenih grinja	47
Slika 22. (lijevo gore) Moromiš, temporalna bara Slika 23. (lijevo dolje) Rijeka Crnojevića, donji tok rijeke Slika 24. (desno) Donja Plavnica (donji tok rijeke)	48
Slika 25. Šematski prikaz toka DNK barkodinga	50
Slika 26. Provjera kvaliteta dobijenih PCR produkata vodenih grinja nakon elektroforeze.	53
Slika 27. Prikaz seta podataka „DS – MNEHYD“ vodenih grinja u BOLD platformi.	59
Slika 28. Rezultat morfološke analize jedinki pijavica roda <i>Glossiphonia</i>	61
Slika 29. Fotografije identifikovanih vrsta roda <i>Glossiphonia</i> sa Zapadnog Balkana.	62
Slika 30. Filogenetsko stablo “najveće vjerovatnoće” (<i>maximum likelihood tree</i>) porodice Glossiphoniidae	65
Slika 31. Procentualna zastupljenost haplotipova koji su najfrekventniji među analiziranim jedinkama pijavica.	73
Slika 32. Mreža haplotipova (eng. <i>median joining network</i>) konstruisana sa 50 <i>COI</i> sekvenci pijavica porodice Glossiphoniidae	74
Slika 33. Mreža haplotipova (eng. <i>median joining network</i>) četiri grupe subklada <i>G. complanata</i> na osnovu 28 analiziranih <i>COI</i> sekvenci.	76
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	80
Slika 36. Distribucija vodenih grinja u Crnoj Gori dobijena na osnovu analize 232 jedinke	84
Slika 37. Filogenetsko stablo vodenih grinja u slivu Skadarskog jezera, konstruisano metodom susjednog sparivanja na osnovu mitohondrijskog <i>COI</i> gena.	88
Slika 38. Filogenija roda vodenih grinja <i>Atractides</i>	105
Slika 39. Mreža haplotipova (eng. <i>median joining network</i>) vodenih grinja roda <i>Atractides</i>	109

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 korišćene za formiranje mreže haplotipova.

Prilog 4: Filogenetsko stablo vodenih grinja Crne Gore.

SKRAĆENICE

A, T, C, G	adenin, timin, citozin, guanin
ASAP	»Assemble Species by Automatic Partitioning«
BIC	» <i>Bayesian Information Criterion</i> «
BIN	»The Barcode Index Number«
BOLD	»The Barcode of Life Data Systems«
bp	bazni par
CCDB	Kanadski centar za DNK Barkoding » <i>Canadian Center for DNA Barcoding</i> «
COI	podjedinica 1 citohrom c oksidaze
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
ML	» <i>maximum likelihood</i> « metoda rekonstrukcije stable
NJ	» <i>neighbour joining</i> « metoda rekonstrukcije stabla
MOTU	molekularna operativna taksonomska jedinica » <i>Molecular Operational Taxonomic Unit</i> «)
mtDNK	mitohondrijska DNK
NHM	Prirodnjački muzej u Beču » <i>Natural History Museum Vienna</i> «
OTU	operativna taksonomska jedinica » <i>Operational Taxonomic Unit</i> «
PCR	lančana reakcija polimeraze
K2P	korigovane genetičke distance » <i>Kimura 2 Parameter</i> «
PD	nekorigovane genetičke distance » <i>pairwise distance</i> «
BLAST	» <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> «
NCBI	» <i>National Center for Biotechnology Information</i> «
TBE	tris-borat-EDTA

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 i vodenih ptica, ali ima i predstavnika koji parazitiraju na sisarima (uključujući i čovjeka) (Siddall & Bowerman 2006, Vamberger & Trontelj 2007, Moser i sar. 2010, Ocegüera-Figueroa i sar. 2011, Cichocka i sar. 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 značajan su dio slatkovodne bentoske faune svih kontinenata (izuzev Antarktika) (Kaygorodova i sar. 2020). Područje Crne Gore naseljava veći broj taksona, među kojima je široko rasprostranjena *Glossiphonia complanata* (Grosser i sar. 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 kojeg se razlikovanje taksona unutar porodice Glossiphoniidae, na osnovu malog broja morfoloških karakteristika značajnih za taksonomiju, pokazalo nedjelotvornim, a često dovodi i do pogrešnih taksonomskih zaključaka (Kaygorodova i sar. 2020).

Da bi se riješile nedoumice prilikom procjene vrsta, molekularno-genetičke analize integrisane su 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 i sar. 2004, Siddall i sar. 2005, Ocegüera-Figueroa i sar. 2011, Kaygorodova & Mandzyak, 2014, Kaygorodova 2020, Darabi-Darestani i sar. 2021). U ovoj disertaciji, standardni filogenetski marker – fragment mitohondrijskog gena za podjedinicu 1 citohrom c oksidaze (*COI*), korišćen je za razdvajanje vrsta pijavica unutar porodice Glossiphoniidae u slivu Skadarskog jezera, ali i na širem području zapadnog Balkana.

Vodne 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 i sar. 2008, 2010). Prisutne su na skoro svim kontinentima (izuzev Antarktika). 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 i sar. 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 i sar. 2007).

Novija istraživanja pokazala su da vodene grinje mogu biti dobri pokazatelji stanja ekosistema, posebno onih koji su zavisni od podzemnih voda (Pešić i sar. 2019c). Međutim, dugotrajna taksonomska identifikacija predstavlja glavnu prepreku za njihovo značajnije učešće u programima brze procjene stanja ekosistema (Weigand i sar. 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 i sar. 2010, Fisher i sar. 2017, Pešić i sar. 2017, 2019a, 2020a, 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 i sar. 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 tijelu) i konstantan broj tjelesnih segmenata (33), koji su dodatno podijeljeni na obično tri do pet, a ponekad na više od 10 prstenova (lat. *amulus*) (Sket & Trontelj 2008). Tijelo je podijeljeno na pet regiona: glaveni, prekliteralni, kliteralni, trupni i repni region (Sawyer, 1986, Nessemann & Neubert 1999). Glava je građena od protostomijuma (lat. *protostomium*) i pet segmenata koji su stopljeni 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. One 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 karakteristikama pijavica (tabela 1).

Iako su hermafroditi, kod pijavica ne dolazi do procesa samooplodnje. Muški polni sistem sačinjen je od 4 do 10 serijalno raspoređenih, okruglih testisa. Od njih vode kratke cjevčice (lat. *vas efferens*) koje 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 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 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 i sar. 2020).

Odstupanje od ovog pravila javlja se kod pojedinih predstavnika porodice Glossiphoniidae, koje čuvaju kokone na trbušnoj strani tijela do izlijevanja mladih. Razviće je direktno, bez larvenih stadijuma (Sket & Trontelj, 2008).

Tabela 1: Podjela pijavica prema načinu ishrane

Predstavnici	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)	Mišićave „mandibule“ koriste za stvaranje površinskih rana na koži kičmenjaka, čijom krvlju se hrane. U ždrijelu se nalaze pljuvačne žlijezde koje luče „hirudin“, enzim koji sprečava zgrušavanje krvi. Crijevo posjeduje brojne divertikulume za skladištenje hrane na duži vremenski period.
Predstavnici porodica Haemopidae, Xerobdellidae i reda Erpobdelliformes (u Evropi samo predstavnici porodice Erpobdellidae)	Makrofagi, gutaju cio plijen npr. larve insekata, rakove, oligohete. Kod ovih pijavica crijevo je u 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 znatno veći udio u cjelokupnoj fauni.

1.1.2. Klasifikacija pijavica

Klasifikacija pijavica predstavljena je prema Nesemann & Neubert (1999), koji su je preuzeli od Sawyera (1986) uz određene modifikacije. Prema njoj Hirudinea imaju status klase i 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), a ona 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. 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	
Red Rhynchobdellida R. Blanchard, 1894	<u>porodica Glossiphoniidae Vaillant, 1890</u>
	porodica Ozobanchidae Pinto, 1921
	porodica Piscicolidae Johnston, 1865
Red Arhynchobdellida R. Blanchard, 1894	podred Hirudiniformes Cabalero, 1952
	podred Erpobdelliformes Sawyer 1986

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 i sar. 2020).

Taksonomija porodice Glossiphoniidae (prema Nesemann & Neubert, 1999)

Phylum: ANNELIDA

Classis: HIRUDINEA

Ordo: RHYNCHOBDELLIDA

Familia: Glossiphoniidae

Genera: *Alboglossiphonia*¹

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 i sar. 2005, Chiangkul i sar. 2021, Kwak i sar. 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 i sar. 2021).

Pijavice porodice Glossiphoniidae sišu tjelesne tečnosti domaćina zahvaljujući proboscisu, muskularizovanom organu koji liči na cijev 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 makrofagni

¹ evropski rodovi (izvor: Fauna Europea ; www.fauna-eu.org)

tip ishrane pokazuje *Alboglossiphonia* sp., tako što proboscisom obavija i guta cio plijen (Kwak i sar. 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 izlijeganja mladih (*Glossiphonia*, *Placobdella*, *Theromyzon* i *Hemiclepsis*).

(b) kokone pričvršćuju direktno na trbušnu stranu tijela do izlijeganja 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 faune pijavk (Hirudinea) v Jugoslaviji“. Prvi katalog pijavica Crne Gore napravio je Šapkarev (1984). Ova dva autora postavila su osnove za istraživanje faune pijavica na ovim prostorima.

Početak 2000-ih povećava se broj istraživanja posvećen ovoj grupi beskičmenjaka. Zabilježene su nove vrste za Crnu Goru (Grosser & Pešić 2005, Grosser i sar. 2007, Utevsky i sar. 2013), a sačinjena je i lista pijavica Crne Gore (Grosser i sar. 2015a).

Od ukupno 29 vrsta pijavica u Crnoj Gori, na području Skadarskog jezera zabilježeno je 52% (Pešić i sar. 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 na ovom području (Grosser i sar. 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 predstavljeni 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	<i>Alboglossiphonia hyalina</i> Lukin, 1976 *	+		+	Grosser i sar. (2015a)
2	<i>Alboglossiphonia striata</i> (Apáthy, 1888) *				Grosser i sar. (2015a)
3	<i>Alboglossiphonia heteroclita</i> (Linnaeus, 1761) *				Grosser i sar. (2015a)
4	<i>Glossiphonia complanata</i> (Linnaeus, 1758) *	+	+	+	
5	<i>Glossiphonia balcanica</i> (Grosser & Pešić 2016)				Grosser i sar. (2016)
6	<i>Glossiphonia concolor</i> (Apáthy, 1888) *			+	
7	<i>Glossiphonia nebulosa</i> Kalbe, 1964 *			+	
8	<i>Glossiphonia paludosa</i> (Carena, 1824) *				Grosser i sar. (2015a)
9	<i>Glossiphonia</i> cf. <i>pulchella</i> Sket, 1968 *			+	
10	<i>Helobdella stagnalis</i> (Linnaeus, 1758) *			+	Grosser i sar. (2015a)
11	<i>Hemiclepsis marginata</i> (O. F. Müller, 1774) *			+	
12	<i>Placobdella costata</i> (Fr. Müller, 1846) *				Šapkarev (1984)

Broj	Vrsta	Blanchard (1905)	Augener (1936-1937)	Sket (1968)	Ostali autori
13	<i>Batracobdelloides moogi</i> Nesemann & Csanyi, 1995 *				Grosser & Pešić (2005)
14	<i>Theromyzon tessulatum</i> (Müller, 1774)			+	
Porodica Piscicolidae Johnston, 1865					
15	<i>Piscicola pawlowskii</i> (Sket, 1968) *				Grosser i sar. (2015a)
16	<i>Piscicola respirans</i> Troschel, 1850				Grosser i sar. (2015a)
Porodica Haemopidae Richardson, 1969					
17	<i>Haemopsis sanguisuga</i> (Linnaeus, 1758) *	+		+	
Porodica Hirudinidae Whitman, 1886					
18	<i>Hirudo verbana</i> Carena, 1820 *				Grosser i sar. (2015a)
19	<i>Hirudo medicinalis</i> (Linnaeus, 1758)	+		+	
Porodica Erpobdellidae R. Blanchard, 1894					
20	<i>Dina absoloni</i> Johansson, 1913 *			+	
21	<i>Dina lineata dinarica</i> Sket, 1968 *			+	
22	<i>Dina cf. lineata montana</i> Sket, 1968	+		+	
23	<i>Dina minuoculata</i> Grosser, Moritz & Pešić, 2007 *				Grosser i sar. (2007)
24	<i>Dina prokletijaca</i> Grosser & Pešić, 2016				Grosser i sar. (2016)

Broj	Vrsta	Blanchard (1905)	Augener (1936-1937)	Sket (1968)	Ostali autori
25	<i>Erpobdella octoculata</i> (Linnaeus, 1758) *	+	+	+	
26	<i>Erpobdella nigricollis</i> (Brandes, 1900) *				Grosser i sar. (2015a)
27	<i>Erpobdella testacea</i> (Savigny, 1822) *				Utevsky i sar. (2013)
28	<i>Erpobdella vilnensis</i> (Liskiewicz, 1925) *				Grosser i sar. (2015a)
29	<i>Trocheta dalmatina</i> (<i>Trocheta subviridis dalmatina</i>) Sket, 1968 *			+	

Rod *Alboglossiphonia* Lukin, 1976

Vrste roda *Alboglossiphonia*, jedini su predstavnici porodice Glossiphoniidae koji posjeduju makrofagni način ishrane (Kwak i sar. 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). Vrsta *A. heteroclita* bila je u prošlosti podijeljena na tri varijeteta, ali oni 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 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 i sar. 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 i sar. 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 i sar. 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 i sar. 2015a).

Rod *Hemiclepsis* Veidovsky, 1884

Rodu *Hemiclepsis* pripada 15 različitih vrsta ektoparazitskih pijavica (Bolotov i sar. 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 i sar. (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: jednom u Evropi, a drugom u Centralnoj Americi. Jedina vrsta iz roda *Placobdella* koja je prisutna u Evropi je *Placobdella costata* (Müller, 1774).

Ovu vrstu je prvi put na području Crne Gore (u okolini Virpazara) zabilježio Šapkarev (1984). Nakon toga, *P. costata* registrovana je na više lokaliteta u slivnom području Skadarskog jezera (Grosser i sar. 2015a).

Rod *Batracobdelloides* Oosthuizen in Sawver

Donedavno je smatrano da rod *Batracobdelloides* sadrži tri vrste, ali Bolotov i sar. (2019), utvrdili su da ovaj rod sadrži najmanje devet vrsta.

Jedina evropska vrsta *Batracobdelloides moogi* Nesemann & Csányi, 1995 nađena je u lokvi pored Danilovgrada, što je 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, nađena 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 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 i sar. 2016).

Do sada je u Crnoj Gori registrovano šest vrsta pijavica koje pripadaju rodu *Glossiphonia*:

- | | |
|-------------------------|------------------------|
| 1. <i>G. complanata</i> | 4. <i>G. concolor</i> |
| 2. <i>G. nebulosa</i> | 5. <i>G. balcanica</i> |
| 3. <i>G. paludosa</i> | 6. <i>G. pulchella</i> |

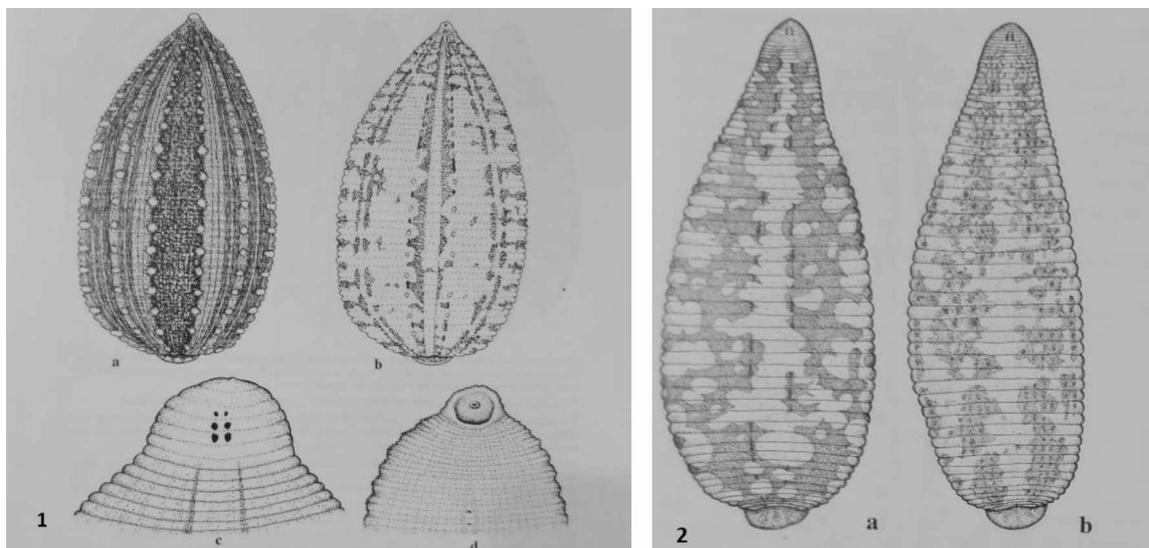
i) *Glossiphonia complanata* (Linnaeus, 1758)

Glossiphonia complanata subsp. *complanata* Linnaeus 1758 i *Glossiphonia complanata* subsp. *maculosa* Sket, 1968, 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 regionu glave 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 i sar. 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.

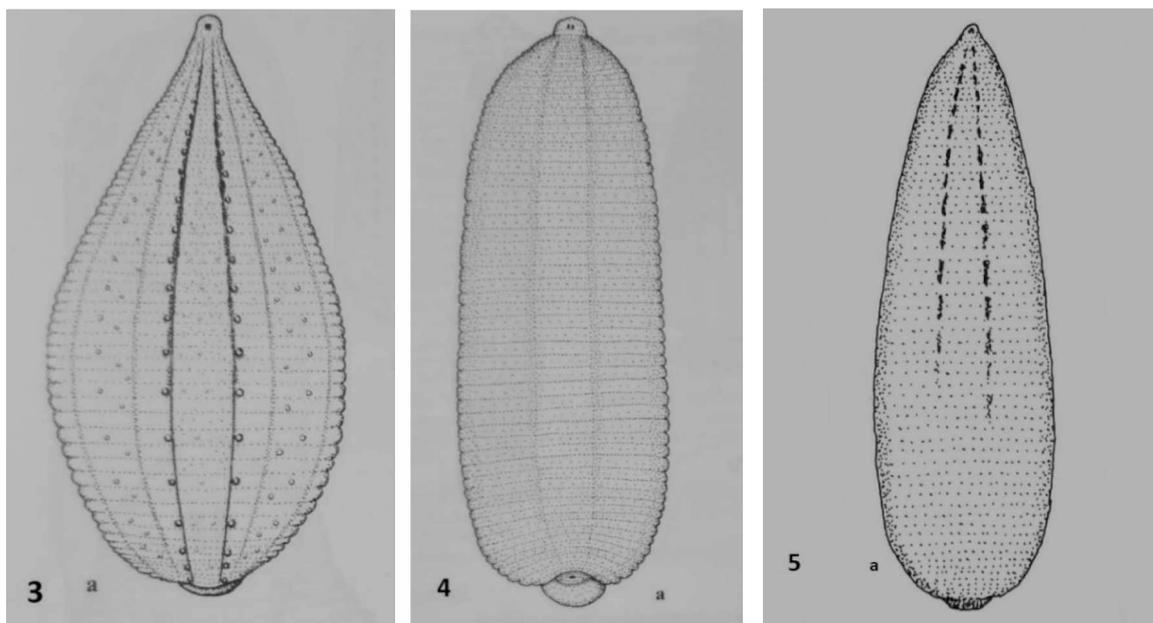
Na području Crne Gore, ova vrsta nađena je po prvi put u Plavskom jezeru (Sket, 1968). Nakon toga, prema Grosser i sar. (2015a) zabilježena i u slivu Skadarskog jezera, ali i na drugim lokalitetima (izvor Prkos u Pljevljima, izvor u blizini Crnog jezera). Prisustvo u slivu Skadarskog jezera, predstavlja najjužniju tačku distribucije ove vrste u Evropi (Utevsky i sar. 2013). Osnovne morfološke karakteristike *G. nebulosa* su: tijelo manjih dimenzija (do 25 mm), repna pijavka manjih dimenzija i gusto zbijena 2 do 3 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 mn.v. (Nesemann & Neubert 1999). Na teritoriji Crne Gore, prema Grosser i sar. (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 i sar. 2015a). Srijeće se u jezerima, barama, rijekama i izvorima na nižim nadmorskim visinama (Nesemann & Neubert 1999). Tijelo dostiže dimenzije do 35 mm. Površina tijela je glatka, pa je jedna od glavnih morfoloških karakteristika 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 i sar. 2015a).

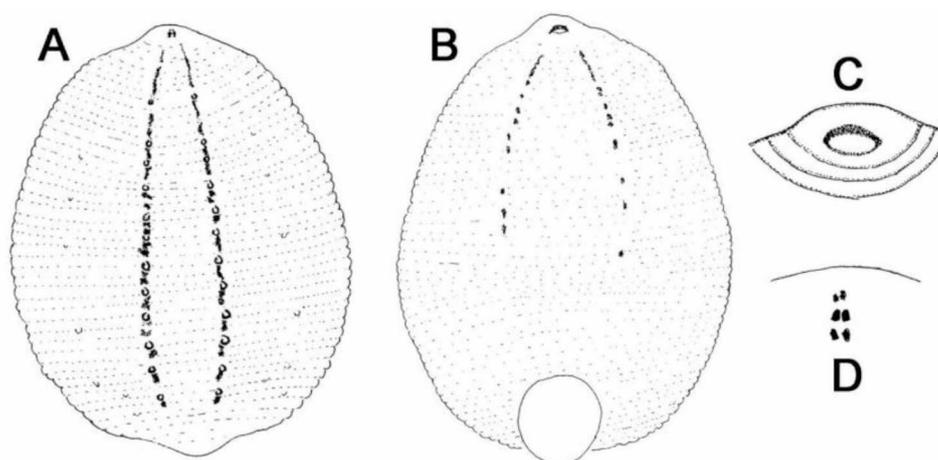


Slika 3. *G. nebulosa* 3a – dorzalno (jedinka sakupljena u Mađarskoj). **Slika 4.** *G. paludosa* 4a – dorzalno (jedinka sakupljena u Mađarskoj) **Slika 5.** *G. concolor* 5a – dorzalno (jedinka sakupljena u Mađarskoj) (preuzeto i modificirano iz Neesemann (1990)).

v) *Glossiphonia balcanica* Grosser & Pešić, 2016

G. balcanica prvi put je sakupljena na izvoru Topla na Kosovu 2014. godine, a zatim su nalazi ove vrste potvrđeni na brojnim staništima u Crnoj Gori (Grosser i sar. 2016). Osim toga, jedinka koja je opisana u litoralnoj zoni Skadarskog jezera kao *G. nebulosa* (Utevsky i sar. 2013), naknadnim pregledom je preimenovana u novoopisanu vrstu *G. balcanica* (Grosser i sar. 2016).

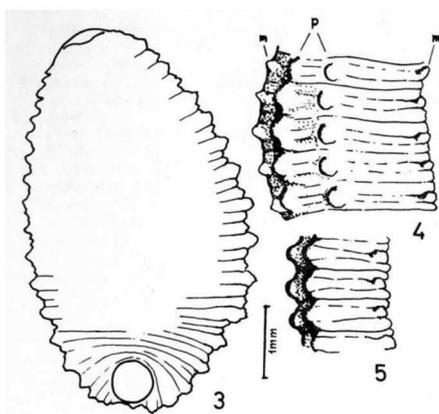
Riječ je o vrsti varijabilnih dimenzija (5-10 mm), koja se od *G. nebulosa* razdvaja na osnovu boje (svijetlo braon u odnosu na sivkasto obojene jedinke *G. nebulosa*) i odsustvu dorzalnih papila. Osim toga, isti autori između ove dvije vrste navode razliku u srednjem naboru na prednjoj pijavki. Ovaj nabor je odlika populacije *G. nebulosa* sa Kosova, ali je slabo razvijen kod populacija ove vrste sa tipskog lokaliteta u Njemačkoj, dok kod predstavnika vrste *G. balcanica* uopšte nije razvijen (slika 6) (Grosser i sar. 2016).



Slika 6. *G. balcanica* A – dorzalno, B – ventralno, C – prednja pijavka, D – raspored očiju (jedinica sakupljena u Dečanima, Kosovo) (preuzeto iz Grosser i sar. 2016).

vi) *Glossiphonia pulchella* Sket, 1968

Vrsta *G. pulchella* nađena je i prvi put za nauku opisana u litoralnoj zoni Ohridskog jezera (Sket 1968). Tijelo dostiže dimenzije do 6 mm, a boja tijela varira od bijele do rozo-sive (slike 7 i 8) (Nesemann & Neubert 1999). Jedinke ove vrste zabilježene su i u slivu Skadarskog jezera (Grosser i sar. 2016).



Slika 7. *G. pulchella* 3 – ventralno, 4 i 5 dorzo-marginalno, m – marginalne, p – paramedijalne bradavice (preuzeto i modificovano prema Sket (1968)). **Slika 8.** *Glossiphonia pulchella* (lijevo) i *Glossiphonia complanata* subsp. *complanata* (desno) (preuzeto iz Minelli i sar. (2014)).

Osim pomenutih, 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 distribucijom ograničenom 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 iz 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 segmentacija), 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 karakteristika 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 i sar. 2005, Oceguera-Figueroa & León-Régagnon 2014, Pérez-Flores i sar. 2016, Mack & Kvist 2019, Kaygorodova i sar. 2020, Darabi-Darestani i sar. 2021). Na taj način riješen je taksonomski status i distribucija jednog broja vrsta.

Sveobuhvatnom filogenetskom analizom unutar roda *Placobdella* (de Carle i sar. 2017), na osnovu više molekularnih markera (*COI*, *NDI*, *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 i sar. (2022), utvrđeno je postojanje sedam nezavisnih filogenetskih linija unutar dosadašnje poznate vrste *Placobdella costata*.

Međutim, raznolikost i razgraničenje vrsta unutar ove grupe beskičmenjaka još su slabo izučavani 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 i sar. 2007). Do sada je širom svijeta opisano oko 7 500 vrsta, grupisanih u 550 rodova (Smit, 2020). Naseljavaju širok spektar staništa: lotička, lentička, intersticijalne i temporalne vode. Jedna od karakteristika ove grupe je veliko bogatstvo zajednica, najčešće praćeno izrazito malom gustom populacijom 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 i sar. 2018).

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 poredane prema alfabetskom redu. Izostavljene su one porodice koje se ne srijeću na području Evrope. Navedena je podjela vodenih grinja prema Bartsch i sar. (2007).

Tabela 4: Klasifikacija vodenih grinja na području Evrope (modifikovano prema Bartsch i sar. 2007).

Nadporodica	Porodica	Podporodica
Stygothrombioidea	Stygothrombiidae	
	Acherontacaridae	
	Hydrovolziidae	
Eylαιοidea	Limnocharidae	Limnocharinae
	Eylaidae	
	Piersigiidae	Piersigiinae
Hydrachnoidea	Hydrachnidae	
Hydrophantoidea	Hydrodromidae	
	Hydryphantidae	Diplodontinae
		Hydryphantinae
		Protziinae
		Pseudohydryphantinae
Tartarothyadinae		

Nadporodica	Porodica	Podporodica
		Euthyadinae
		Wandesiinae
Lebertioidea	Anisitssiellidae	Anisistsiellinae
		Nilotoniinae
	Bandakiopsidae	
	Lebertiidae	
	Oxidae	
	Rutripalpidae	
	Sperchontidae	Sperchontinae
	Teutoniidae	
	Torrenenticolidae	Torrenticolinae
Hygrobatoidea	Aturidae	Albiinae
		Aturinae
		Axonopsinae
	Feltriidae	
	Frontipodopsidae	
	Hygrobatidae	Hygrobatinae
	Lethaxonidae	
	Limnesiidae	Kawamuracarinae
		Limnesiinae
	Pionidae	Foreliinae
		Huitfeldtiinae
		Tiphyinae
	Pontarachnidae	
	Unionicolidae	Pionatacinae
Unionicolinae		
Wettinidae		
Arrenuroidea	Acalyptonotidae	
	Arrenuridae	
	Athiennemanniidae	Athiennemanniidae
	Bogatiidae	Bogatininae
	Chappuisididae	Chappuisidinae
	Hungarohydracaridae	Hungarohydracarinae

Nadporodica	Porodica	Podporodica
		Balcanohydracarinae
	Krendrowskiidae	
	Mideidae	
	Momoniidae	Momonidinae
		Momoniinae
		Stygomomoniinae
	Mideopsidae	Mideopsinae
	Neoacaridae	
	Nudomideopsidae	

1.4.2. Životni ciklus

Vodene grinje imaju složene životne cikluse koji ih povezuju sa nizom vodenih beskičmenjaka (slika 9).

Nakon embrionalnog razvića oplodjenih 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). 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). Zahvaljujući ovom stadijumu, vodene grinje su danas rasprostranjene u svim slatkovodnim ekosistemima umjerenog i tropskog pojasa (Dabert i sar. 2016).

Nakon larvene faze, počinje faza protonimfe, koja predstavlja prvu latentnu fazu vodenih grinja, tokom koje se protonimfa zakopava u sediment i razvija u deutonimfu. Ova faza može trajati i do nekoliko mjeseci, ako su uslovi nepovoljni (Belozarov, 2009). U fazi deutonimfe vodene grinje izlaze iz sedimenta i žive kao aktivni predatori (Smith i sar. 2001). Tritonimfe su druga latentna faza vodenih grinja, u kojoj prelaze iz deutonimfe u odrasle (adultne) jedinke.

U adultnom stadijumu aktivni su predatori, i hrane se 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

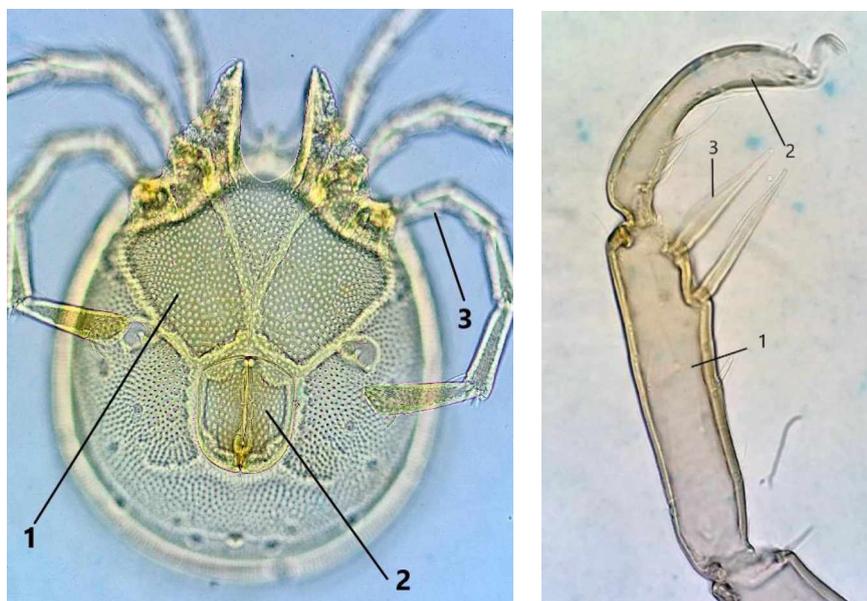
Dimenzije adultnih jedinki Hydrachnidia kreću se u rasponu od 0,2 do 10 mm (Davids i sar. 2007), mada najveći broj vodenih grinja dostiže dimenzije od 0,5 do 2 mm.

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 i sar. 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 dodatka, odnosno helicera i pedipalpi (Mitchell 1962, Davids i sar. 2007). Helicere služe za probijanje integumenta plijena i završavaju se kliještima (Davids i sar. 2007). Pedipalpi imaju taktilnu i raptorijalnu ulogu (prilikom hvatanja plijena). Sastoje se od pet pokretnih segmenata (redom od prvog do petog): trohanter, femur, genu, tibija i tarsus (Davids i sar. 2007, Di Sabatino i sar. 2010).

Idiozoma je okruglog ili ovalnog oblika, blago dorzoventralno spljoštena i većinom nesklerotizovana (Smith i sar. 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 i sar. 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, zavisno od njihove namjene – da li služe za hodanje, plivanje ili za prihvaćanje. Sastoje se od šest pokretnih segmenata, redom: trochanter, basifemur, telofemur, genu, tibia i tarsus. Prvi bazalni segmenti (kokse), inkorporisani su na ventralnoj strani tijela. Kod onih vrsta vodenih grinja koje su bolji plivači noge imaju duže segmente prekrivene nizovima tankih seta (slika 11) (Smith i sar. 2001).

1.4.4. Anatomske karakteristike

Sistem organa smješten je u hemocelu okupaniom hemolimfom, koja cirkuliše pokretima tjelesne muskulature (Schmidt 1935, Mitchell 1962, Smith i sar. 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. Nakon toga ona se transportuje kroz usta, muskulozno ždrijelo i jednjak, do srednjeg crijeva, gdje se odvijaju procesi digestije i apsorpcije (Bader 1938, Smith i sar. 2001). Svi divertikulumi srednjeg crijeva završavaju se slijepo, nema povezanosti između crijeva i ekskretorne pore (Smith i sar. 2001).

Ekskretorni sistem predstavljen je sistemom cjevčica koje su smještene u neposrednoj blizini srednjeg crijeva. Konačne ekskretorne produkte apsorbuje hemolimfa i skladišti u ekskretorne cjevčice u vidu bijelih ili žutih nerastvorljivih kristala nepoznatog hemijskog sastava (Smith i sar. 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 i sar. 2001). Međutim, one su nefunkcionalne kod deutonimfi i adultnih 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 i sar. 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 i sar. 2001).

Muški polni sistem čine parni testisi i sjemevodi, koji vode u ejakulatorni kompleks (Barr 1972, Smith i sar. 2001), odnosno sistem membranoznih komora koji služi za skladištenje spermatozoida. Ovaj kompleks podsjeća na špric, pomoću kojeg se spermatozoidi izbacuju iz genitalnog trakta kroz gonoporu (Davids i sar. 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 i sar. 2001, Davids i sar. 2007).

1.5. Pregled istraživanja faune vodenih grinja u Crnoj Gori

Istraživanje faune vodenih grinja u Crnoj Gori počelo je prije više od jednog vijeka, odnosno 1903. godine. Veliki broj studija doprinio je opisivanju 201 vrste, koliko je do sada poznato u Crnoj Gori (prilog 1). To čini 50% od 400 vrsta opisanih na Balkanu (Pešić i sar. 2018a).

Najraniju publikaciju o vodenim grinjama sa područja bazena Skadarskog jezera objavio je češki zoolog Thon (1903). Sadržala je listu od 13 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 i sar. 1999-2022).

1.6. Primjena molekularnih metoda u taksonomiji vodenih grinja

Najveći broj poznatih vrsta vodenih grinja opisan je na osnovu morfoloških karakteristika, a broj radova koji uključuju molekularno genetičke metode, u cilju provjere i dopune ovih opisa, i dalje je relativno oskudan (Blattner i sar. 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 i sar. 2014, Montagna i sar. 2016, Elbrecht i sar. 2017, Blattner i sar. 2019). Metode koje su nedavno razvijene, poput metabarkodinga (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), koji uključuje uniparentalno nasljeđivanje, ili jedarnom genomu (nDNK) kada ispituje biparentalno nasljeđivanje (Stryjecki i sar. 2016). Studija Blattnera i sar. (2019), pokazala je da pri odabiru molekularnih markera treba biti obazriv, u skladu sa ciljevima istraživanja. Analiza fragmenta *COI* gena mtDNK, kao standardnog barkoding 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 koja kombinuje morfološke karakteristike i molekularne podatke (Martin i sar. 2010, Dabert i sar. 2016, Fisher i sar. 2017, Pešić i sar. 2017, Pešić i sar. 2019a, b, Pešić i sar. 2020b, c, d), omogućila je otkrivanje prethodno zanemarenih ili pogrešno identifikovanih vrsta vodenih grinja. Na osnovu molekularnih analiza, Martin i sar. (2010) utvrdili su da se kompleks vrsta označen kao *Hygrobates 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 i sar. (2016) koristili su više molekularnih markera na osnovu kojih su izveli zaključke o filogenetskim odnosima unutar viših taksonomskih kategorija (nadporodica) vodenih grinja. Pešić i sar. (2017)

istraživali su kompleks *Hygrobates 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 i sar. 2020a). Osim toga, unutar kompleksa vrsta *H. nigromaculatus* opisane su dvije nove vrste *H. lacrima* i *H. limnocrenicus* (Pešić i sar. 2020c).

1.7. Filogenija

Filogenija je naučna disciplina koja se bavi izučavanjem evolutivne prošlosti različitih 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. Homoplazije predstavljaju sličnosti između pojedinih taksona koji nijesu rezultat nasljeđivanja od 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, 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 tog stabla i njegovu analizu.

Najbitniji element u proučavanju srodničkih intra- i interspecifičnih odnosa je odabir 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 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 dvodimenzionalni grafik, tzv. filogenetsko stablo, koje prikazuje odnose između organizama i sastoji se 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.

Filogenetska stabla mogu biti ukorijenjena i neukorijenjena. Ukorijenjeno stablo sadrži čvor (korijen) koji predstavlja zajedničkog pretka. Stabla se ukorjenjuju pomoću spoljašnje grupe (eng. *outgroup*). Ona nije član analiziranog taksona, ali je sa njim blisko povezana. Neukorijenjena stabla predstavljaju srodničke odnose između taksona bez stvaranja hipoteza o zajedničkim precima i evolutivnom putu (Hall, 2007).

U opisivanju filogenetskih odnosa između taksonomskih jedinica razlikujemo monofiletsku, parafiletsku i polifiletsku grupu. Monofiletska grupa se u sistematici naziva klada (eng. *clade*), i čine je članovi koji potiču od zajedničkog pretka, karakterističnog samo za tu grupu. Parafiletska grupa sadrži najmlađeg zajedničkog pretka i neke (ali ne sve) njegove potomke. Polifiletska grupa sadrži taksone koji nijesu evoluirali od zajedničkog pretka i nastaje kao rezultat konvergentne evolucije (Whitley & Lieberman, 2011). Osim korišćenja 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*).

Najčešće korišćene 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 se na kraju minimalizovala ukupna dužina stabla.
- Metoda najveće uštede (MP; eng. *Maximum parsimony*) (Swoford, 2001) bazira se na stanjima karaktera i koristi strategiju iscrpnog pretraživanja. 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 i sar. 1999) relativno je nova metoda stanja karaktera, a bazira se na vjerovatnoći koja su procijenjena 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 razvića i stručnost taksonoma (Waterton i sar. 2013). Otkako je 2003. godine metoda DNK barkodinga predložena kao pouzdan način određivanja vrsta (Hebert i sar. 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 prirodnjačke muzeje širom svijeta (preko 150 zemalja) (Valentini i sar. 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, upravljanje 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 (Avise i sar. 1987). Pomoću filogeografije pokušavamo da zaključimo 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, istorijske geografije i geologije (Avise, 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 (Avise, 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 kojeg svi mitohondrijski haplotipovi potiču od zajedničkog pretka. Koalescenca je model isključivanja linija iz genetičkog drifta, a on 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 utiču 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, vrste se šire na područja koja su primjerenija za preživljavanje. 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 je neistraženo. Glavna hipoteza, koju su nedavno formulisali Grabowski i sar. (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. U tom periodu, 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 i sar. 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 se malo zna 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 rasvjetljavanju 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 (slike 12 i 13). Osim toga, jedno je od najbogatijih slatkovodnih područja na svijetu, sa prosječnom izdašnošću od 54 l/s/km² (Radulović M. i sar. 2015, Radulović M. 2018). Površina sliva Skadarskog jezera iznosi 5.631 km², od čega 81 % pripada teritoriji Crne Gore, a nešto više od 1.000 km² Albaniji (Radulović M. i sar. 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).

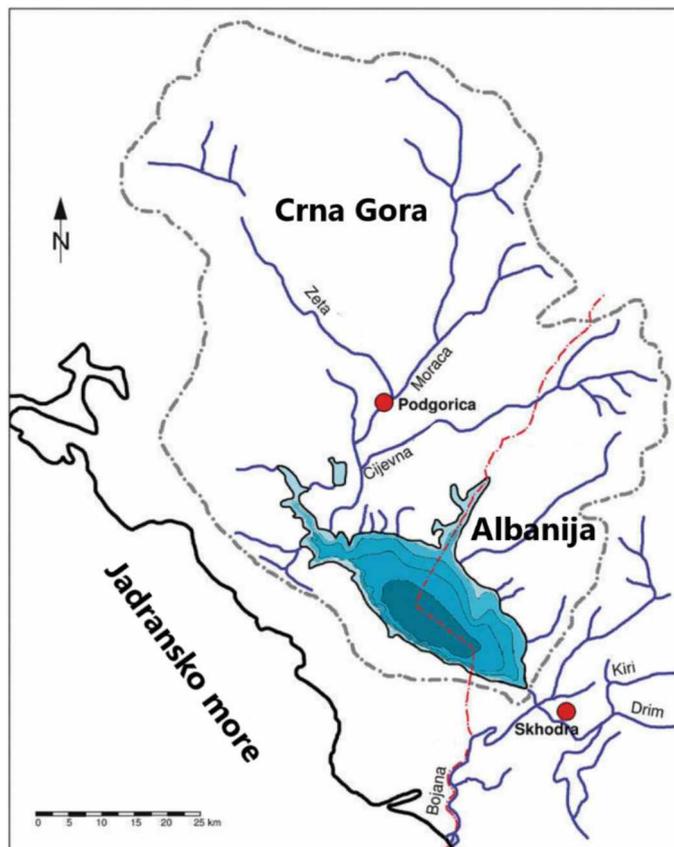


Slika 12. Pogled sa Bobije na Skadarsko jezero (fotografija: Zlatko Pavićević)

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. i sar. 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 voda 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 djelovi površine dna ispod morskog ogleđala (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 i sar. 2018). Prosječna dubina jezera kreće se

između 4,4 i 8,3 m (Radulović M. i sar. 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 i sar. 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 metamornih stijena sa brojnim magmatskim eruptivima (na sjevernom dijelu sliva), do isključivo karbonatnih stijena u njegovom centralnom i južnom dijelu (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 i sar. 2018).

Nedavna studija od strane Mazzini i sar. (2015) pokazala je da se Skadarsko jezero može smatrati veoma mladim vodenim tijelom, koje je nastalo prije 1.200 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 i sar. (2015), poklapa se sa istorijskim zapisima o ovom području. Italijanski humanista i istoričar Merula (1474), u svojim zapisima prvi navodi postojanje Skadarskog jezera. Od 1513. godine, ono je uvijek zastupljeno na geografskim kartama, kako navodi i Jireček (1916) u 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 i sar. 2018). Prema pomenutim autorima, nastao je prije više od 2,5 miliona godina i tokom 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 (Pešić i sar. 2018b). Ona je 1965. godine transformisana u biološku stanicu Instituta za biološka i medicinska istraživanja. Od 1973. godine, ova naučna jedinica djeluje u okviru Univerziteta „Veljko Vlahović“, a devedesetih 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 i sar. 2018b).

Limnološka istraživanja i procjena biodiverziteta Skadarskog jezera, kroz saradnju SFR Jugoslavije i Sjedinjenih Američkih Država, započeti 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 i sar. 2018b).

2.1.4. Filogenetska istraživanja

Na području sliva Skadarskog jezera detaljne taksonomske/filogenetske analize, koje uključuju 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 i sar. 2017, Jabłońska 2018) i hidrobidne puževe (Falniowski i sar. 2012).

Sworobowicz (2015) i Wysocka i sar. (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 i sar. (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 i sar. (2018) opisali su novu vrstu slatkovodnih kozica, *Atyaephyra vladoi*, čija je distribucija povezana sa sublakustričnim izvorima u Crnoj Gori.

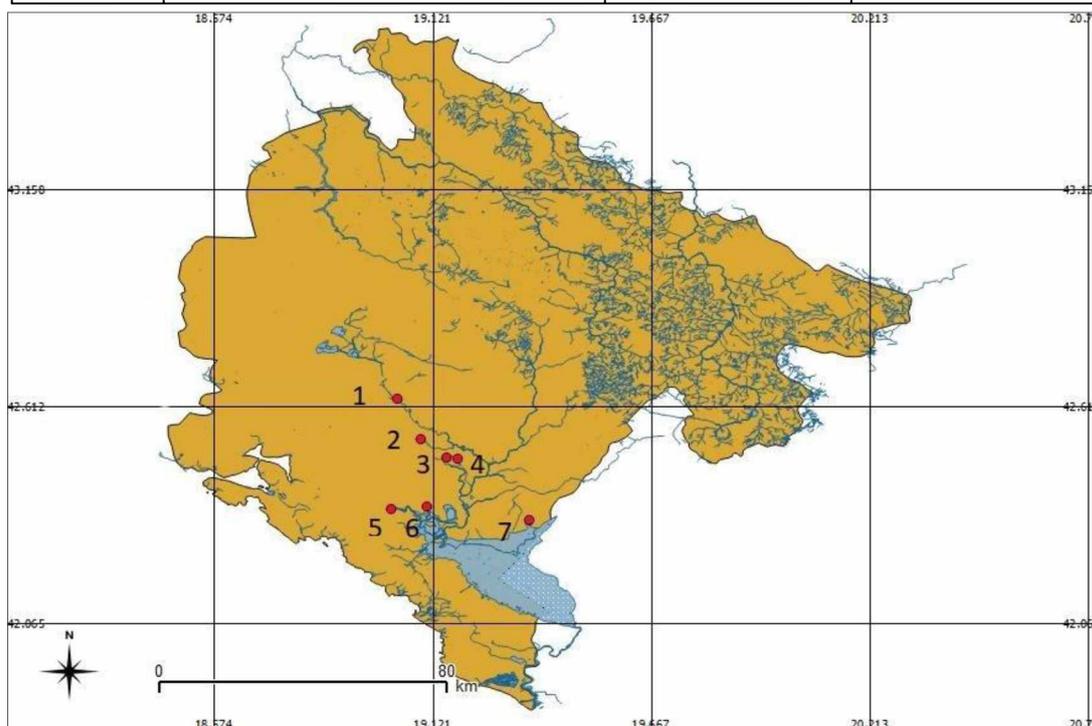
Sve navedene studije pokazale su odsustvo tipičnih lakustričnih endema.

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, slike 14, 15. i 16). Tokom terenskog istraživanja zabilježeni su podaci o prikupljenim vrstama, području istraživanja i korišćenju 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	pečinski 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.



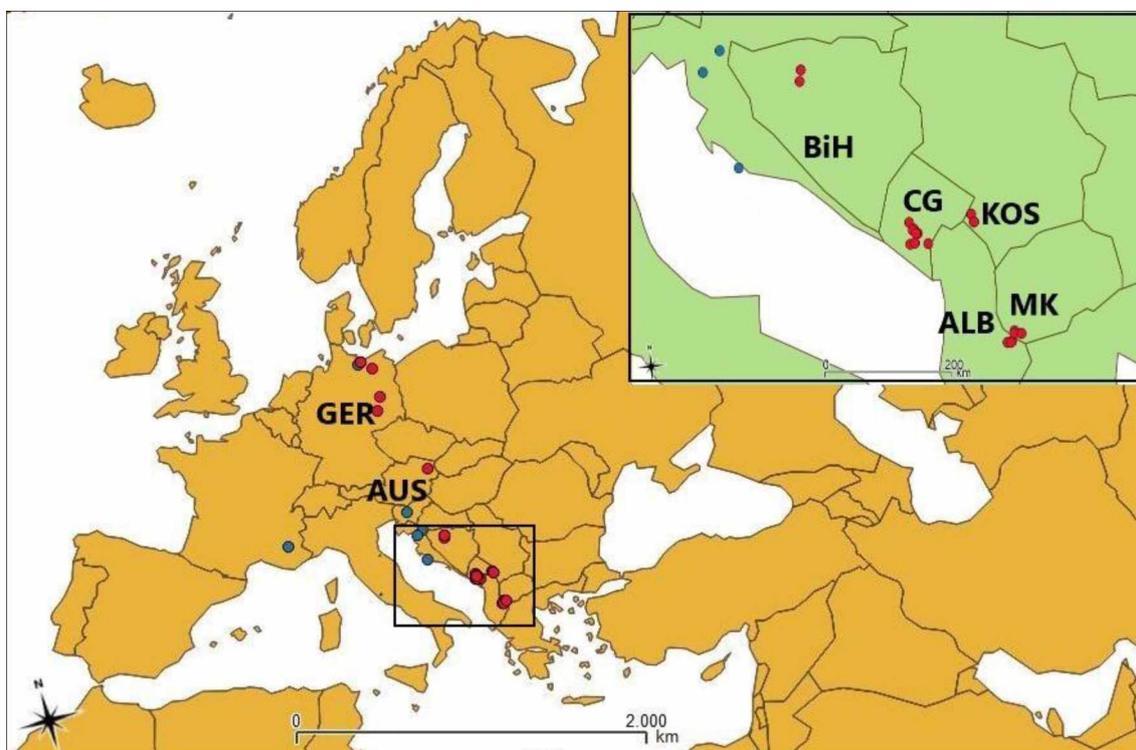
Slika 15. (lijevo) Karuč, sublakustrični izvor (fotografija: M. Jovanović) Slika 16. (desno) Crmo oko, limnokreni izvor (fotografija: M. Jovanović)

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 i sar. 2016).



Slika 17. Sakupljanje pijavica (slika lijevo – ručno sakupljanje (fotografija: Ana Manović), slike desno i dolje – sakupljanje ručnom mrežicom (fotografije: A. Manović, M. Jovanović).

Osim u slivnom području Skadarskog jezera, pijavice su sakupljane 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 i sar. 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 sakupljane 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, 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 molekularno-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. *vaucher* – pojedinačna životinja koja služi kao dokazni materijal), sačuvani u DNK zbirci Prirodnjačkog muzeja u Beču, kao dokazni muzejski materijal (slika 19).

Odabran je gen koji kodira subjedinicu citohrom oksidaze mitohondrijske DNK (eng. *COI*), a koji je već korišćen 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>).

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 96 % etanolom i papirnim ubrusima. Izolacija genetičkog materijala izvršena je pomoću DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, 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), vorteksovali 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 kolone sa silikatnom gel membranom (DNeasy Mini spin column) i tubicama (centrifugirkama) od 2 ml,
- sadržaj je centrifugiran jedan minut na 8.000 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 14.000 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 8.000 obr/min.

Umnožavanje (eng. *amplification*) izolovanog genetičkog materijala izvršeno je lančanom reakcijom polimeraze (PCR eng. *Polymerase Chain Reaction*). PCR predstavlja brzu, specifičnu i osjetljivu metodu umnožavanja odabranih DNK fragmenata u *in vitro* uslovima. Umnožen je *COI* region ukupne dužine ~ 708 baznih parova (eng. *base pair* - bp).

Oligonukleotidni prajmeri (početnice) korišćeni za umnožavanje fragmenta DNK su:

LCO1490, 5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' i

HCO2198, 5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (Folmer i sar. 1994).

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 pri 72 °C. Ova tri koraka ponavljaju se ciklično 35 puta, što rezultira velikim brojem kopija željenog PCR produkta zbog eksponencijalne prirode reakcije. Posljednji korak je hlađenje uzoraka, kojim se omogućava kratkoročno čuvanje reakcijske smješe dok se epruvete ne preuzmu iz PCR uređaja (tabela 6).

Tabela 6: Uslovi PCR reakcije

Korak PCR reakcije	Temperatura / °C	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	94	3min	1
Denaturacija	94	30s	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, korišćena je negativna kontrola koja je umjesto DNK sadržala vodu, a služila je kao kontrola potencijalne kontaminacije pojedinih hemikalija i pribora.

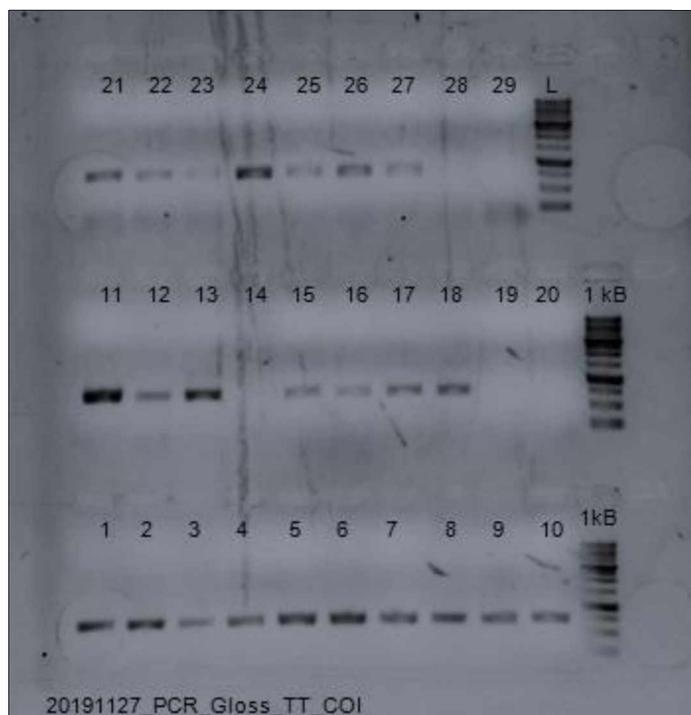
Tabela 7: Sastav PCR reakcione smješe od 25 μl

Reagensi	Zapremina
ddH ₂ 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, pri čemu kraći molekuli putuju brže kroz gel.

Za potrebe ovog rada korišćen je jednogodni agarozni gel, koji je pripremljen rastvaranjem 1 g agaroze u 100 ml 1x TBE pufera (tris-borat etilendiamintetraoktenu kiselina) sa 100 μl etidijum bromida koncentracije 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Etidijum bromid je boja koja interkalira u molekul DNK i omogućava vizuelizaciju fragmenata DNK pod uticajem UV zračenja.

Na gel se nanosilo 5 μ g 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 vizueliziran na UV transluminatoru i fotografisan digitalnim foto-aparatom (slika 20).



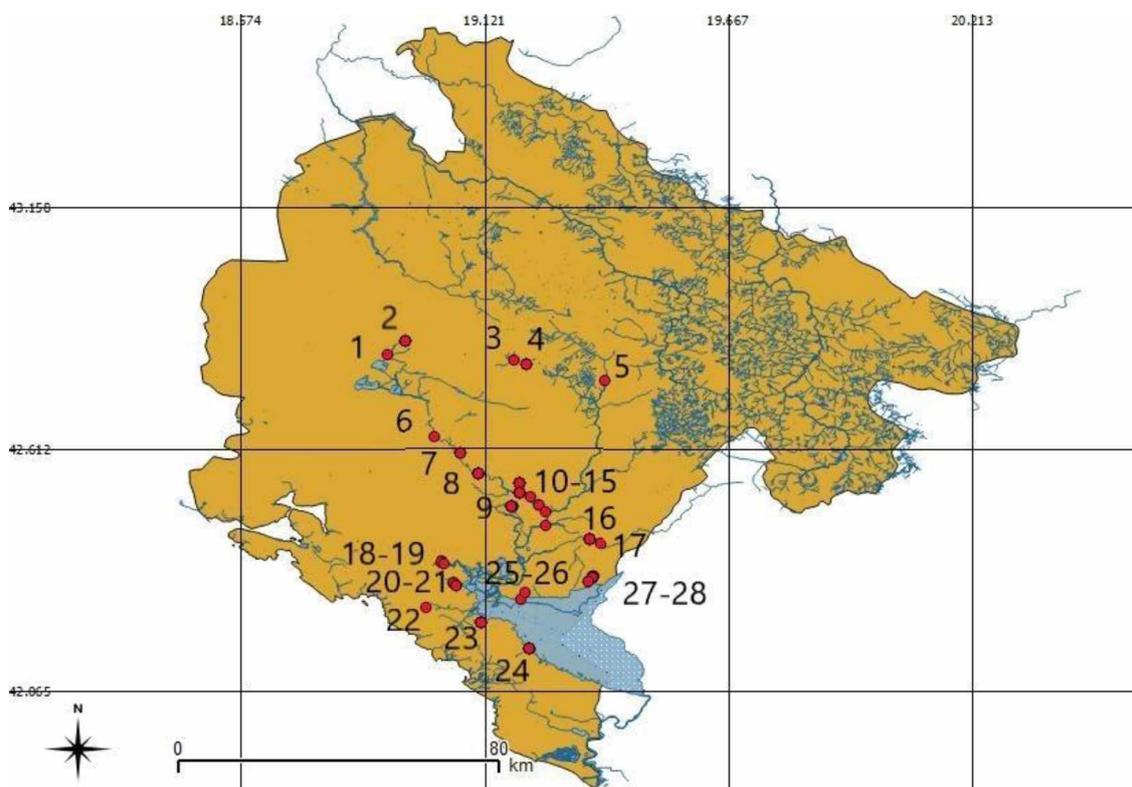
Slika 20. Provjera kvaliteta dobijenih PCR produkata pijavica nakon elektroforeze.

Za prečišćavanje proizvoda amplifikacije korišćen 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 korišćeni u amplifikaciji fragmenata DNK.

2.4. Uzorkovanje i morfološke analize vodenih grinja

U periodu od 2018. do 2021. godine, vodene grinje sakupljane su na lentičkim i lotičkim staništima na području sliva Skadarskog jezera. Uzorkovanje je vršeno na 28 lokaliteta (slika 21). Mjesta uzorkovanja su fotografisana i zabilježene su geografske koordinate (slike 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 Cmojevića, donji tok rijeke (fotografija: M. Jovanović) **Slika 24.** (desno) Donja Plavnica (donji tok rijeke) (fotografija: V. Pešić)

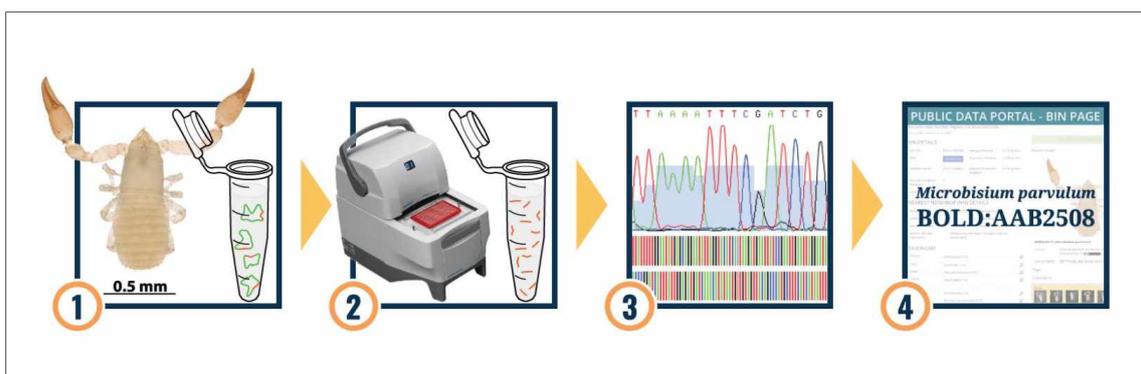
Uzorkovanje je vršeno pomoću ručnih mrežica promjera okaca 500 μm . Materijal je sačuvan u 96% etanolu i transportovan u Laboratoriju za biodiverzitet Prirodno-matematičkog fakulteta, gdje je prema dostupnoj literaturi (Bartsch i sar. 2007, Di Sabatino i sar. 2010, Gerecke i sar. 2016), identifikovan 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 sakupljane 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	Tuzi, rijeka Cijevna, Dinoša	80 m	donji tok rijeke
17	Tuzi, 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 i sar. 2007), PCR reakciju (Ivanova & Grainger 2007a) i sekvencioniranje (Ivanova & Grainger 2007b) 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 barkodinga (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*), a on se uz 18S i 28S ribozomalne jedarne markere najčešće koristi za rekonstrukciju filogenetskih odnosa unutar grupe Hydrachnidia (Dabert i sar. 2016, Blattner i sar. 2019). DNK ekstrakti, nakon izvršene izolacije, zamrznuti su na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u Centru za Biodiverzitet i genomiku (CBG; www.biodiversitygenomics.net), a vaučeri vraćeni Studijskom programu za biologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, 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 i sar. (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 °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 µl Sol T pufera; sadržaj je promiješan, vorteksovan i inkubiran deset minuta na 70 °C,
- u lizat je dodato 350 µl 96% etanola,
- sadržaj je vorteksovan i centrifugiran jedan minut na 10.000 obr/min ,
- 600 µl ovog sadržaja prenijeto je u tubice sa silikatnom gel membranom (spin column), u koje je prethodno dodato 350 µl aktivacionog pufera T,
- sadržaj je centrifugiran jedan minut na 10.000 obr/min; iz sabirne epruvete odstranjen je filtrat,
- preostali lizat prenesen je u nove tubice i centrifugiran 2 minuta na 10.000 obr/min, zatim je još jednom ponovljen postupak odlivanja filtrata,
- dodato je po 500 µl pufera za čišćenje (Wash TX1) i (Wash TX2), koje je pratilo centrifugiranje od 2 min na 10.000 obr/min i odlivanje filtrata,
- posljednji korak je dodavanje 50 µl prethodno ugrijanog pufera za ispiranje na silikatnu gel membranu kolona. Nakon inkubacije od 2 minuta na sobnoj temperaturi, tubice su centrifugirane jedan minut na 10.000 obr/min. Na kraju, postupak centrifugiranja ponovljen je još jednom.

Ekstrahovana DNK skladištena je u na temperaturi od 2 – 8 °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').

Protokol za pripremu PCR reakcione smješe od 20 μ l:

4,8 μ l dd H₂O

10 μ l 10 x PCR pufera

1,6 μ l + 1,6 μ l prajmera (LCOJJ © HCOJJ)

2 μ l ekstrahovane DNA

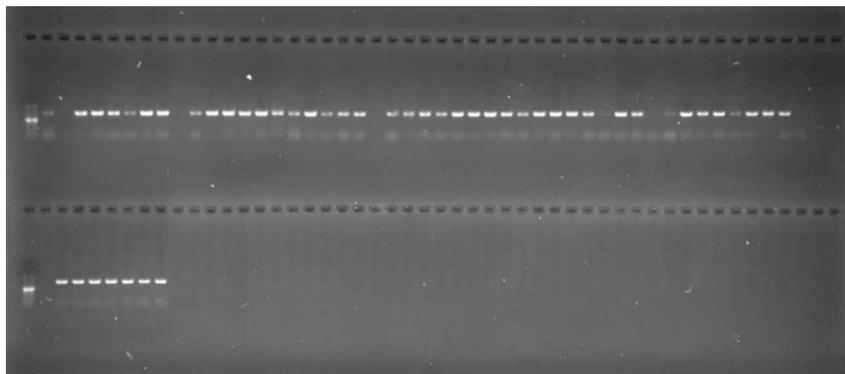
Vremensko temperaturni program PCR reakcije činili su:

Početna denaturacija	94 °C	3 min	
Denaturacija	94 °C	30 s	
Hibridizacija	45 °C	1 min 30 s	5 ciklusa
Elongacija	72 °C	60 s	
Denaturacija	94 °C	30 s	
Hibridizacija	51 °C	1 min 30 s	35 ciklusa
Elongacija	72 °C	60 s	
Konačna elongacija	72 °C	5 min	
Hlađenje	∞	10 min	

Uspješnost PCR reakcije provjerena je metodom elektroforeze u agaroznom gelu. Korišten je jednogodni agarozni gel, koji je pripremljen rastvaranjem 1 g agaroze u 100 ml 1x TBE pufera (tris-borat etilendiamintetraoktenu kiselina) sa 100 μ l etidijum bromida koncentracije 0,5 μ g/ml.

Na gel se nanosilo 5 μ g 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 vizueliziran na UV transluminatoru i fotografisan digitalnim foto-aparatom (slika 26).



Slika 26. Provjera kvaliteta dobijenih PCR produkata vodenih grinja nakon elektroforeze.

PCR produkti poslani su na čišćenje i sekvencioniranje (u jednom smjeru) u komercijalni servis Naturalis Biodiversity Center (Lejden, Holandija). Analiza je izvedena Sangerovom metodom, upotrebom prajmera koji su korišćeni 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 i sar. 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 analize pijavica obuhvatio je 52 sekvence, uključujući podatke iz ovog istraživanja i one dostupne u banci gena (GenBank).

Program korišćen za analizu poravnatih sekvenci i rekonstrukciju filogenetskih stabala je MEGA X softver, verzija 10.1.7 (Kumar i sar. 2018). Analize su sprovedene filogenetskim metodama: najveće vjerovatnoće (ML; eng. *maximum likelihood*) i susjednog sparivanja (NJ; eng. *neighbour joining*).

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. 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 korišćena je metoda *bootstrap*. Podrška za grananje unutar filogenetskih stabala određena je na osnovu 500 *bootstrap* ponavljanja za ML i NJ analizu. Parametri analiza za podatke postavljeni su na isti način. U NJ metodi korišćene su *p*-distance, a u analizu su uključene tranzicije i transverzije. U analizi statističkom metodom ML korišćeni 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 i sar. 2012) sa 10^6 generacija. Filogenetska stabla uređena su u programu CorelDRAW Graphics Suite X7 (<http://www.coreldraw.com>).

Nekorigovane genetičke udaljenosti (PD; eng. *p-distance*) i korigovane genetičke udaljenosti (K2P; eng. *Kimura two-parameter distance*), unutar i između linija otkrivenih filogenetskim analizama, procijenjenih u programu MEGA.

Sekvence roda *Glossiphonia* grupisane su u jedinstvene haplotipove pomoću softvera DnaSP version 6.0 (Rozas i sar. 2017). U istom programu izračunati su i parametri genetičkog diverziteta iztraživanih populacija: diverzitet haplotipova (Hd), diverzitet

nukleotida (π), prosječan broj nukleotidnih razlika (k), varijabilna (polimorfna) mjesta (VPS) i 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), koja 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 verzija (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html>) 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 i sar. 2021).

Pored ASAP analize, u analizi pijavica korišćen je mPTP pristup za razdvajanja vrsta, predložen od strane Kapli i sar. (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 vrijeme 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 poravnavanje nukleotidnih sekvenci

Sekvence vodenih grinja preuzete od Macrogen Inc. provjerene su u programu BLAST (eng. *Basic Local Alignment Tool*) (Altschul i sar. 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 nukleotidima 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 korišćen za analizu poravnatih sekvenci odabranog roda *Atractides* i rekonstrukciju filogenetskih stabala je MEGA X softver, verzija 10.1.7 (Kumar i sar. 2018). Analize su sprovedene metodom susjednog sparivanja (NJ; eng. *neighbour joining*).

Vrijeme divergencije vodenih grinja iz roda *Atractides* određeno je korišćenjem programskog paketa BEAST ver. 1.7.4 (Drummond i sar. 2012) na osnovu bajesijanske evolutivne analize. Procjena vremena divergencije rađena je za *COI* set podataka sa intervalima 95% pouzdanosti pod različitim evolutivnim modelima (Wilke i sar. 2009). Korišćen 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 1.000 (10 %) uzorkovanih stabala odbačeno je iz analize (*burn-in*). Pouzdanost analize provjerena je u programu Tracer ver. 1.5 (Rambaut & Drummond, 2009). Programom TreeAnnotator ver. 1.7.2 (Drummond i sar. 2012) generisano je konsenzus filogenetsko stablo sa izračunatim vremenima divergencije. 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 i sar. 2017). U istom programu izračunati su i parametri genetičkog diverziteta istraživanih populacija: diverzitet haplotipova (H_d), diverzitet nukleotida (π), prosječan broj nukleotidnih razlika (k), 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

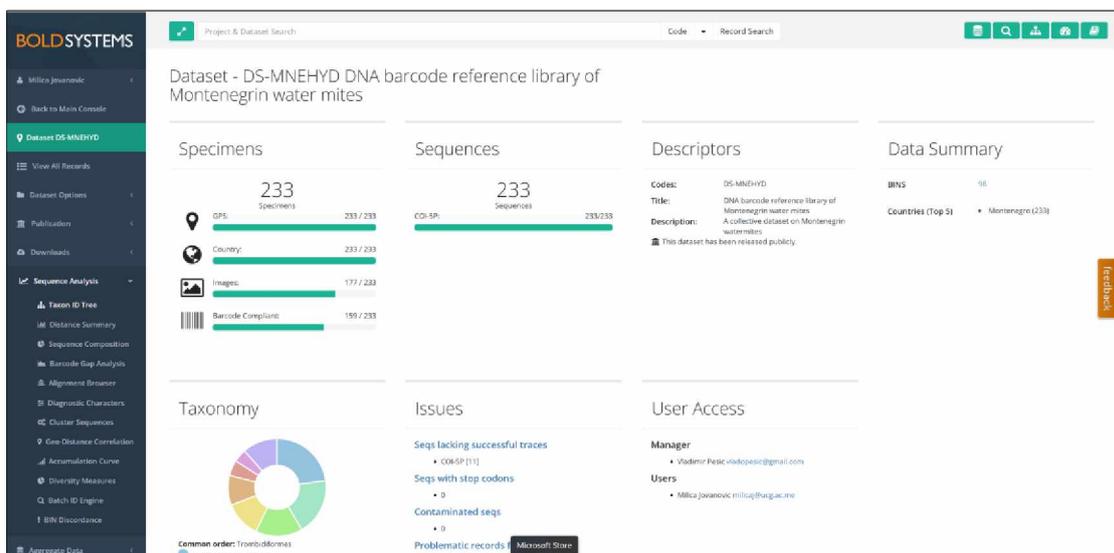
U BOLD bazi kreirani su projekti sa DNK barkod sekvencama vodenih grinja (morfološko određivanje, pol, osoba koja je morfološki odredila primjerak, vrijeme i mjesto sakupljanja, geografske koordinate itd.). Navedeni projekti mogu biti privatni – dostupni samo osobi koja ih je kreirala (i osobama koje 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 korišćena 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 (javnim 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 korišćena 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.



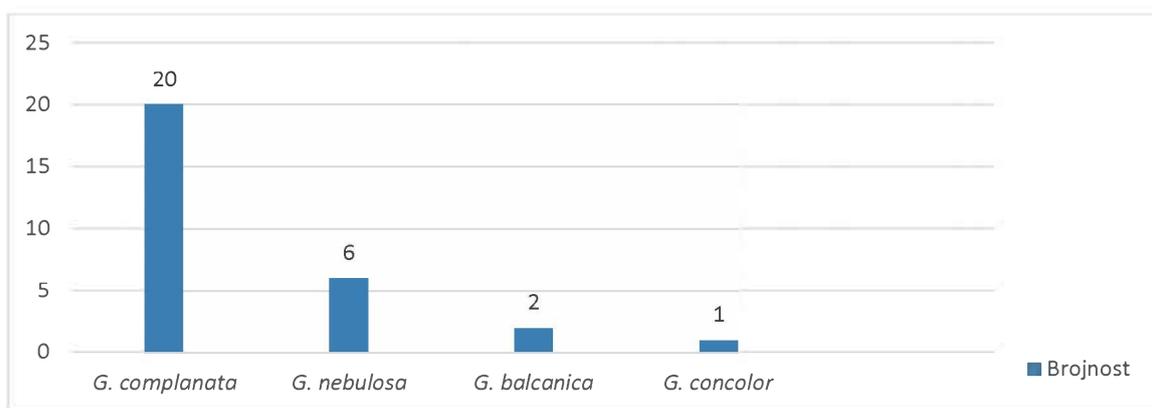
Slika 27. Prikaz seta podataka „DS – MNEHYD“ vodenih grinja u BOLD platformi.

Svim sekvencama vodenih grinja dodijeljeni su BIN-ovi, prema algoritmu koji poredi sve *COI* sekvence u BOLD bazi. Izuzetak je 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).



Slika 28. Rezultat morfološke analize 29 jedinki pijavica roda *Glossiphonia*.

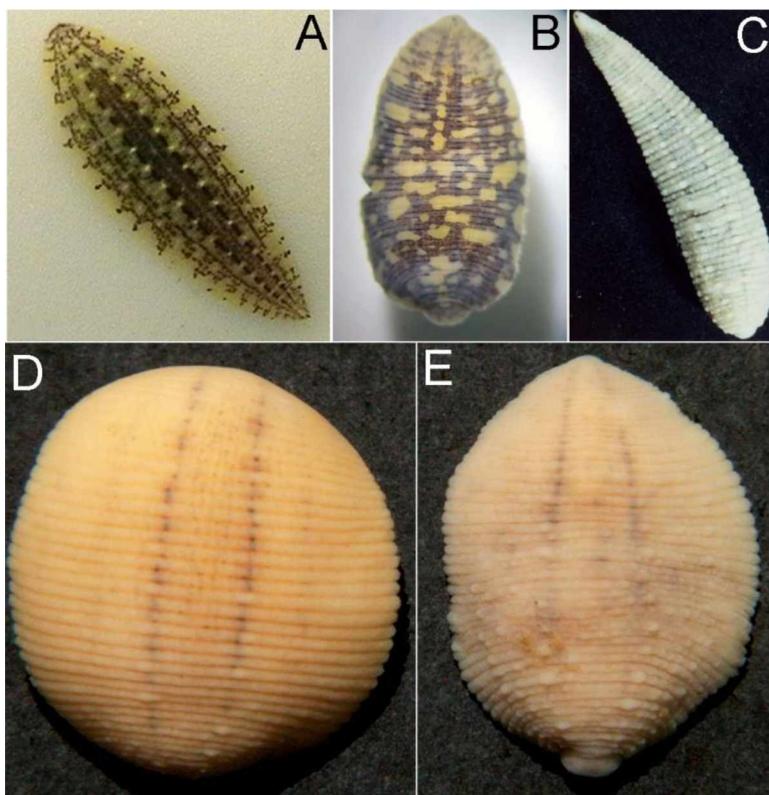
Osnovne morfološke karakteristike najvećeg broja vrsta roda *Glossiphonia* su prisustvo šest očiju i istaknute papile na srednjem dijelu tijela (prstenu a2). Predstavnici roda *Placobdella* imaju dva para očiju, a *Helobdella* samo jedan par.

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 jedinke koje pripadaju podvrstama *G. complanata complanata* i *G. complanata maculosa*. Jedinke 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).

Jedinke 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 sive. 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*, Ohridsko jezero (Sjeverna Makedonija), C – *G. nebulosa*, rijeka Helme (Njemačka), D – *G. balcanica*, izvor Toplla (Kosovo), E – *G. cf. nebulosa*, izvor Toplla (Kosovo), (autori fotografija: C. Grosser (A, D, E), V. Pešić (B), J. Händel (C), preuzeto iz Jovanović i sar. 2021).

3.1.2. Rezultati molekularno-genetičkih analiza pijavica

Ovim istraživanjem generisana su 33 DNK barkoda (*COI* sekvence) koji pripadaju porodici Glossiphoniidae, u punoj dužini od 658 baznih parova (Jovanović i sar. 2021). Konačni set podataka koji je korišćen 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 sjevernoamerički 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. Osim toga, odnosi među kladama slabo su podržani ovom filogenetskom metodom (slika 30). Zbog toga su u daljem tekstu za evropske predstavnike roda *Glossiphonia* opisani 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 jedinice 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 jedinice 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 jedinice sakupljene u Njemačkoj,

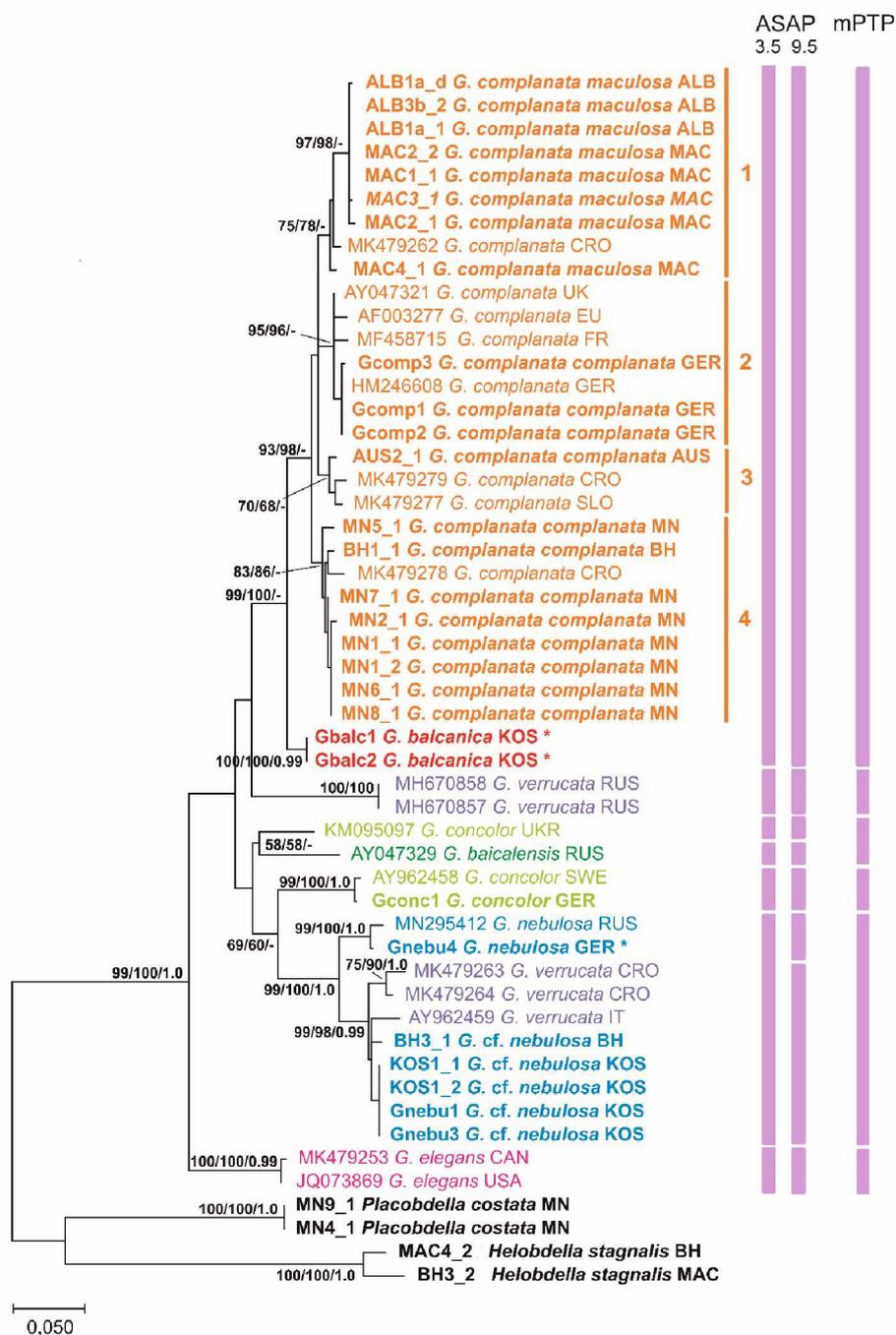
Francuskoj i Ujedinjenom Kraljevstvu. Subklada 3 sačinjena je od jedinki sakupljenih u Austriji, Hrvatskoj i Sloveniji, a subklada 4 sadrži jedinke sakupljene u Bosni i Hercegovini, Hrvatskoj i Crnoj Gori.

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 u Rusiji. 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 $\geq 0,98$ (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 jedinice sa tipskih lokaliteta (*locus typicus*) (preuzeto i modificirano iz Jovanović i sar. 2021).

Tabela 9: Nazivi taksona, informacije o lokalitetima i BOLD / GenBank brojevi za jedinke pijavica korišćene u filogenetskoj analizi. BOLD ID dati su za sekvence iz ove disertacije, dok je za sekvence iz prethodnih studija upisan GenBank ID.

ID jedinke (haplotip)	Lokalitet (Stanište, država)	Koordinate	BOLD / GenBank ID	Reference
<i>Glossiphonia verrucata</i>				
ROMIZ I11753	Neimenovana rijeka, Hrvatska (CRO)	43.574722°N, 15.818889°E	MK479263	Mack & Kvist (2019)
ROMIZ I11755	Neimenovana rijeka, Hrvatska (CRO)	43.574722°N, 15.818889°E	MK479264	Mack & Kvist (2019)
	rijeka Sade, Italija (IT)		AY962459	Siddall i sar. (2005)
	rijeka Chechuy, Rusija (RUS)	58.194640°N 109.294720°W	MH670857	Kaygorodova i sar. (2020)
	jezero blizu Megeta, Rusija (RUS)	52.451440°N, 104.027120°W	MH670858	Kaygorodova i sar. (2020)
<i>Glossiphonia complanata complanata</i>				
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)	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, 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, <i>locus typicus</i> (GER)	53.9147°N, 11.2815°E	LCHME038-20	Ova disertacija
Gcomp2	potok jezera Barschsee, Mecklenburg-Vorpommern, Njemačka, <i>locus typicus</i> (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	Ova disertacija
	rijeka Duro, Francuska (FR)		MF458715	Corse i sar. (2017)
	Evropa (EU)		AF003277	Sidall & Bureson (1998)
	Creek, Mecklenburg- Vorpommern, distrikt Nordwestmecklenburg, Njemačka (GER)	53.81848°N, 10.92799° E	HM246608	Trajanovsky i sar. (2010)
	Ujedinjeno Kraljevstvo (UK)		AY047321	Light & Siddall (1999)
ROMIZ I11749	rijeka Korana, 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)
<i>Glossiphonia complanata maculosa</i>				
MAC1_1	Sv. Naum, izvor Crnog Drina, Ohridsko jezero, Sjeverna Makedonija (MAC) – <i>locus typicus</i>	40.9138°N, 20.7433°E	LCHME020-20	Ova disertacija
MAC2_1	Lagadin, Ohridsko jezero, Sjeverna Makedonija (MAC)	41.0422°N, 20.8039°E	LCHME021-20	Ova disertacija

MAC2_2	Lagadin, Ohridsko jezero, Sjeverna Makedonija (MAC)	41.0422°N, 20.8039°E	LCHME022-20	Ova disertacija
MAC3_1	Peštani, Ohridsko jezero, Sjeverna Makedonija (MAC)	41.0095°N, 20.8059°E	LCHME023-20	Ova disertacija
MAC4_1	Oteševo, 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
<i>Glossiphonia concolor</i>				
Gconcl	Krakower Obersee, Mecklenburg-Vorpommern, Njemačka (GER)	53.6074°N, 12.2976°E	LCHME041-20	Ova disertacija
	rijeka Kila, Švedska (SWE)		AY962458	Siddall i sar. (2005)
	Ukrajina (UKR)		KM095097	Kaygorodova & Mandzyak (2014)
<i>Glossiphonia balcanica</i>				
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
<i>Glossiphonia nebulosa</i>				
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 i sar. (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, blizu kaštela, Bosna i Hercegovina (BH)	44.7657°N, 17.193°E	LCHME002-20	Ova disertacija
Gnebu1	izvor Toplla, Dečani, Kosovo (KOS)	42.57194° N, 20.29056°E	LCHME042-20	Ova disertacija
Gnebu3	izvor Toplla, Dečani, Kosovo (KOS)	42.57194° N, 20.29056°E	LCHME043-20	Ova disertacija
<i>Glossiphonia elegans</i>				
ROMIZ II1505	nepoznata lokva, Nopiming, Manitoba, Kanada (CAN)	50.452222°N, 95.5125°W	MK479253	Mack & Kvist (2019)
	jezero Bemidji, država Beltrami, Minesota, (SAD)		JQ073869	Moser i sar. (2012)
<i>Glossiphonia baicalensis</i>				
	Bajkalsko jezero, Rusija (RUS)		AY047329	Light & Siddall (1999)
“Outgrupe”				
<i>Placobdella costata</i>				
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
<i>Helobdella stagnalis</i>				
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 od 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%). 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 i sar. 2020). „Barkod praznina“ za analizirani set podataka procijenjena je na 4-8%. Ovom metodom identifikovano 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*. Pri graničnoj vrijednosti od 3,59% (K2P) (ali sa slabijim ASAP rezultatom 9,5%), 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 su visoko divergentne linije *G. baicalensis* i *G. concolor* grupisane u jednu vrstu (slika 30).

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	<i>G. complanata</i> (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	<i>G. balcanica</i> (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	<i>G. verrucata</i> 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	<i>G. concolor</i> 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	<i>G. baicalensis</i> (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	<i>G. concolor</i> 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	<i>G. nebulosa</i> (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	<i>G. cf. nebulosa</i> (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	<i>G. elegans</i> (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	<i>Helobdella stagnalis</i> (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	<i>Placobdella costata</i> (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)

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 (tabele 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)	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).

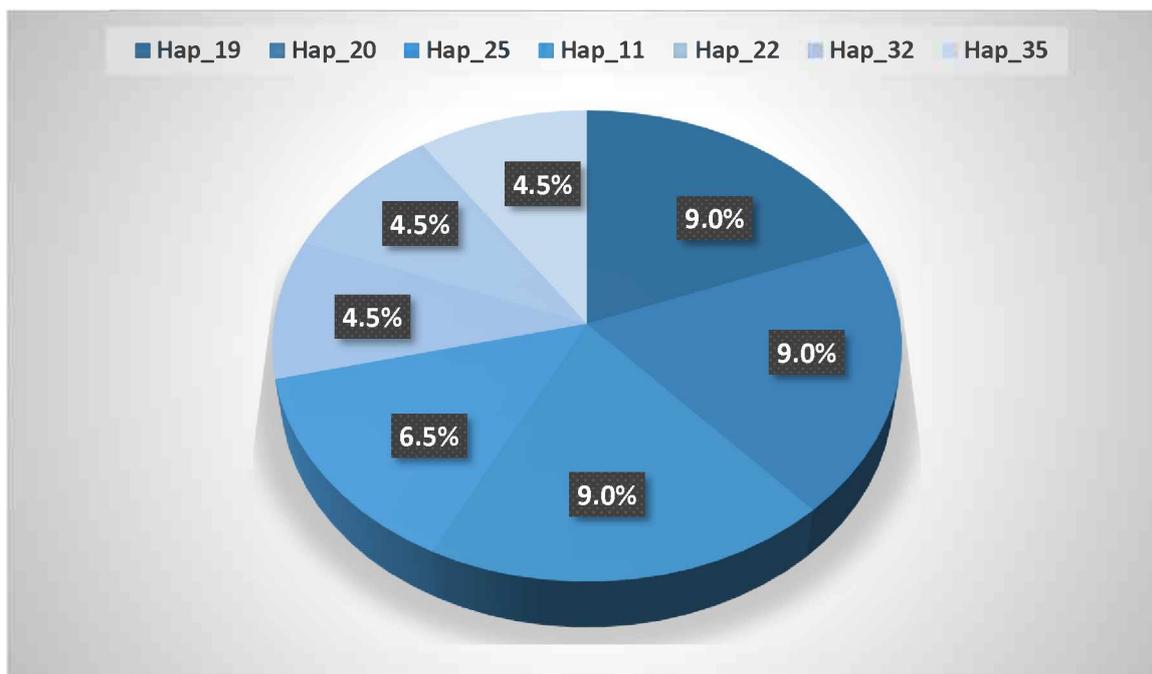
Diverzitet *COI* haplotipova iznosio je $Hd = 0,98$. U okviru *COI* sekvenci bilo je 208 polimorfni mjesta, od kojih je 185 parsimonijski informativno.

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 (tabele 11. i 12).



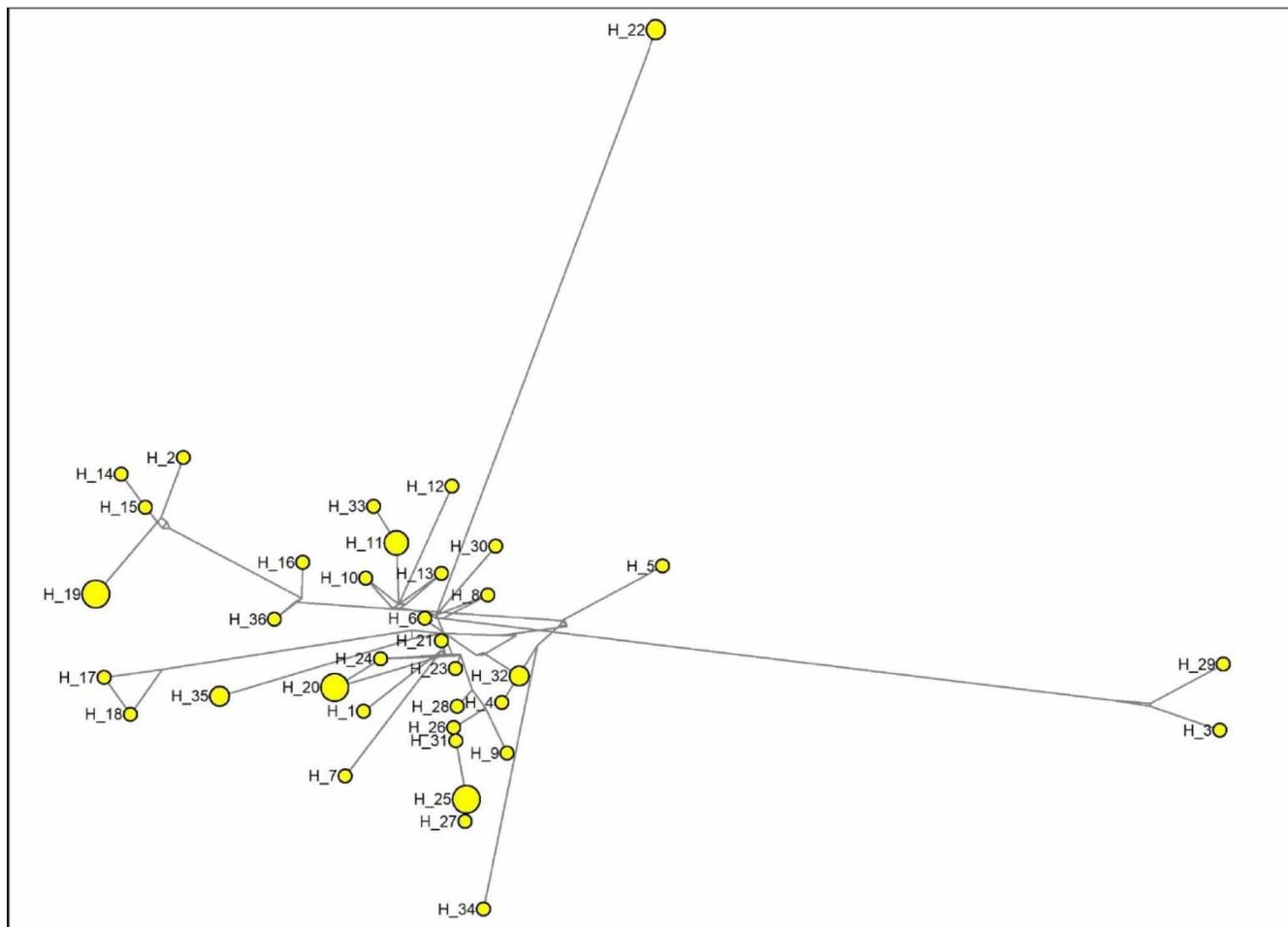
Slika 31. Procentualna zastupljenost haplotipova koji su najfrekventniji među analiziranim jedinkama pijavica.

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 ovu analizu, 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.



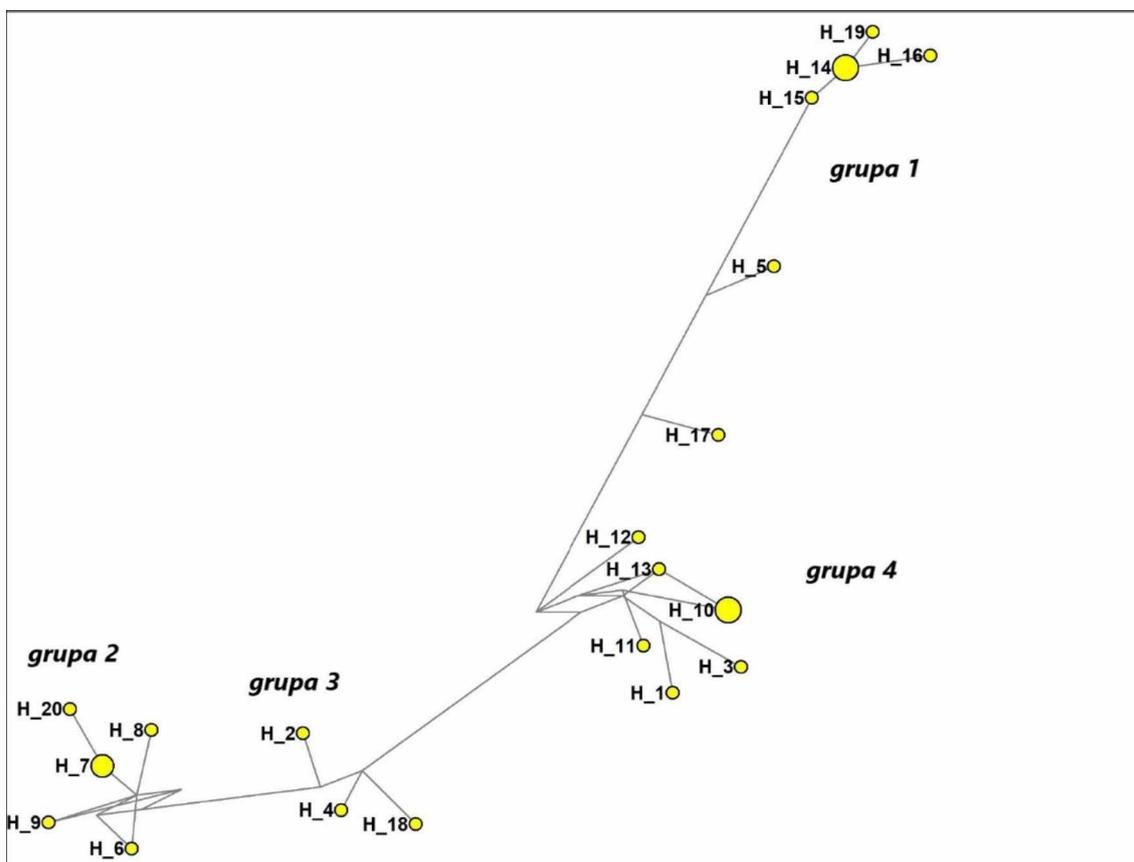
Slika 32. Mreža haplotipova (eng. *median joining network*) konstruisana u programu NETWORK ver. 4.2.0.1 sa 50 *COI* sekvenci pijavica porodice Glossiphoniidae. Veličina krugova proporcionalna je frekvenciji predstavljenog haplotipa. Oznake haplotipova koje nose jedinke date su u Tabeli 11.

Tabela 12: Haplotipovi za *COI* sekvence analiziranih pijavica

Broj	Vrsta	Haplotip	Sekvence
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	Gconc1
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 (slike 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 različiti broj uzoraka sa lokaliteta na kojima su sakupljene pijavice. Rezultati su pokazali da su skoro svi haplotipovi terminalni, a da je malo unutrašnjih (predačkih). 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	<i>G. c. complanata</i> BH	Hap 1	BH1 1
2	<i>G. c. complanata</i> CRO	Hap 2	MK479279
3	<i>G. c. complanata</i> CRO	Hap 3	MK479278
4	<i>G. c. complanata</i> SLO	Hap 4	MK479277
5	<i>G. c. complanata</i> CRO	Hap 5	MK479262
6	<i>G. c. complanata</i> EU	Hap 6	AF003277
7	<i>G. c. complanata</i> GER	Hap_7	HM246608 Gcomp1 Gcomp2
8	<i>G. c. complanata</i> SLO	Hap 8	MF458715
9	<i>G. c. complanata</i> FR	Hap 9	AY047321
10	<i>G. c. complanata</i> MN	Hap_10	MN1_1 MN1_2 MN6_1 MN8_1
11	<i>G. c. complanata</i> MN	Hap 11	MN2 1
12	<i>G. c. complanata</i> MN	Hap 12	MN5 1
13	<i>G. c. complanata</i> MN	Hap 13	MN7 1
14	<i>G. c. maculosa</i> MAC/ALB	Hap_14	MAC1_1 MAC2_2 Alb1a_1 Alb3b_2
15	<i>G. c. maculosa</i> MAC	Hap 15	MAC2 1
16	<i>G. c. maculosa</i> MAC	Hap 16	MAC3 1
17	<i>G. c. maculosa</i> MAC	Hap 17	MAC4 1
18	<i>G. c. complanata</i> AUS	Hap 18	AUS2 1
19	<i>G. c. maculosa</i> MAC	Hap 19	ALB1a d
20	<i>G. c. complanata</i> 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 jedinice 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 jedinice 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 barkodinga i pod tim imenom navedene 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 (slike 37, 1, 2, 3. i 4. dio). Najdominatniji rodovi su *Lebertia* sa devet vrsta, *Atractides* sa osam 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 barkoda, što odgovara broju od 86 morfološki identifikovanih vrsta i 100 BIN-ova (Pešić i sar. 2021a). To predstavlja 43% cjelokupne faune vodenih grinja Crne Gore (prilog 2). Sve novodobijene 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	Min Dist (%)	Sred Dist (%)	Max Dist (%)	SE Dist (%)
Unutar vrsta	200	53	391	0.00	2.43	24.16	0.01
Unutar rodova	207	14	2291	6.09	20.20	42.37	0.00
Unutar porodica	168	7	1054	16.17	37.14	63.16	0.01

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 klastera 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 Cmojevića, novi nalaz za Balkansko poluostrvo (fotografije: Vladimir Pešić).

3.2.2.2. Nova vrsta za Crnu Goru iz roda *Atractides*

Ovim istraživanjem prvi put je zabilježen nalaz vrste *Atractides latipes* (Szalay, 1935) u fauni vodenih grinja Crne Gore.

Morfološki opis: Prugasti integument, umeci mišića nesklerotizovani. Genitalno područje sa acetabulom 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 i sar. 2009 (iz Irana), ima slične morfološke karakteristike, 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 vrsta 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 izduženoovalna; boja tijela žućkastosmeđa. Ženke imaju veće dimenzije od mužjaka. Dorzalni štit je u prednjem dijelu tijela odvojen od ventralnog štita. Mužjaci: dužina/širina idiozome 485-530/377-410 μm ; dužina/širina dorzalnog štita 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 . Ženke: dužina/širina idiozome 570-620/412-460 μm ; dužina/širina dorzalnog štita 560-580/410-430 μm , 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 μm .

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, jedne 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 1.200-1.800 µm.

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 µm; dorzum često sa ovalnim štitom; dužina segmenata P-4: 155-196; P-5: 82-94 µm. Ženke: dužina/širina idiozome 885-1950/495-1350 µm; 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 µm.

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 Poseljanim). S obzirom da je 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.

Jedini 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* (četiri), *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 *Parabbranchypoda montii*, koja je nova vrsta u fauni Crne Gore.

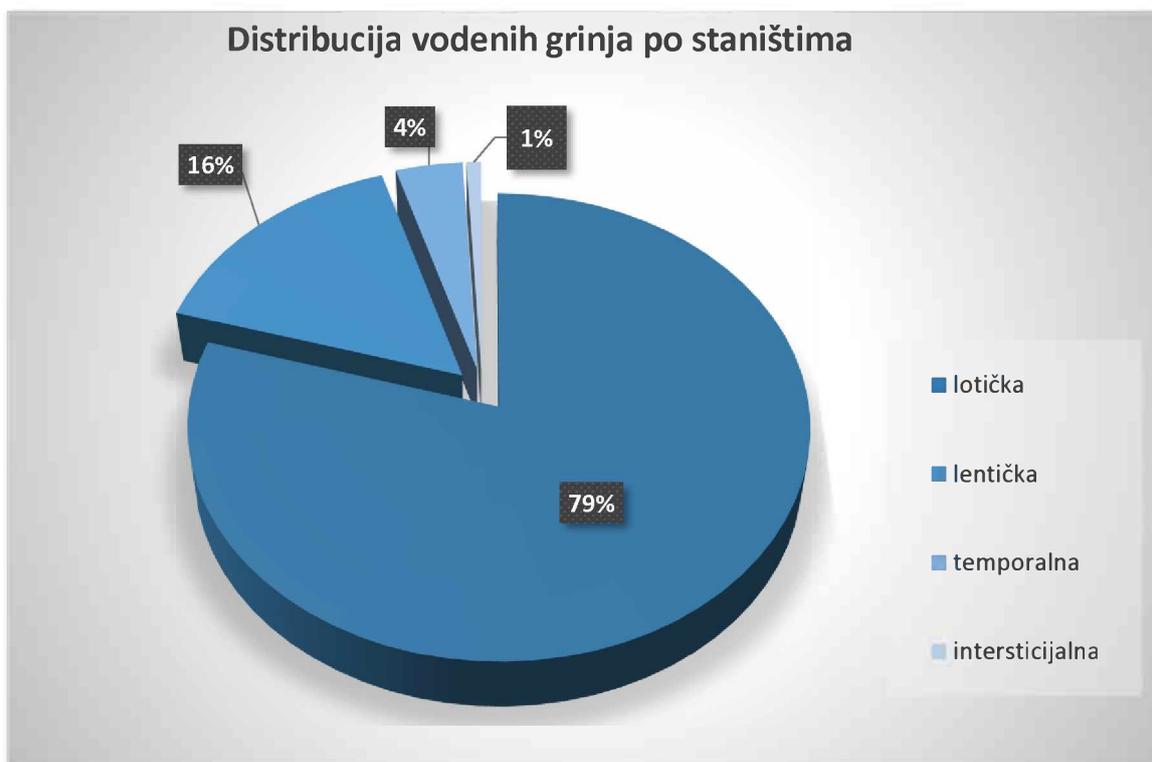
Povremeno, neke vrste koje se javljaju u lentičkim staništima sakupljene su u lotičkim staništima i naseljavaju područja duž obala sa smanjenim protokom vode. Takve su vrste *Neumania imitata* i *Mundamella germanica*.

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*, zabilježen je 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 refractarioulus*.

U ovoj disertaciji, raznovrsnost vodenih grinja u intersticijalnim vodama u slivu Skadarskog jezera slabo je ispitana. Jedini 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.



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, 2, 3. i 4. dio). Filogenetski odnosi rekonstruisani su korišćenjem 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, odvaja se sekvenca 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 jadranae* (slika 37, 1. dio).

Porodica Limnocharidae na stablu je postavljena kao spoljna linija sa samo jednom sekvencom u ovoj studiji, *Limnochares 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, koju 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 clupeifer* 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 vrste: *Pseudotorrenticola rhynchota*, *Torrenticola meridionalis*, *T. laskai* i *Monatractides madritensis*. Drugu subkladu čine: *Torrenticola brevirostris* i jedina sekvenca vrste *Lebertia cuneifera*.

Vrsta *Sperchon thienemanni* čini odvojenu liniju, ona je predstavljena kao spoljna raznovrsnom klasteru koji 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 čini 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 *Arremurus* - *A. refractarioulus* i *A. cylindratus* (slika 37, 3. dio).

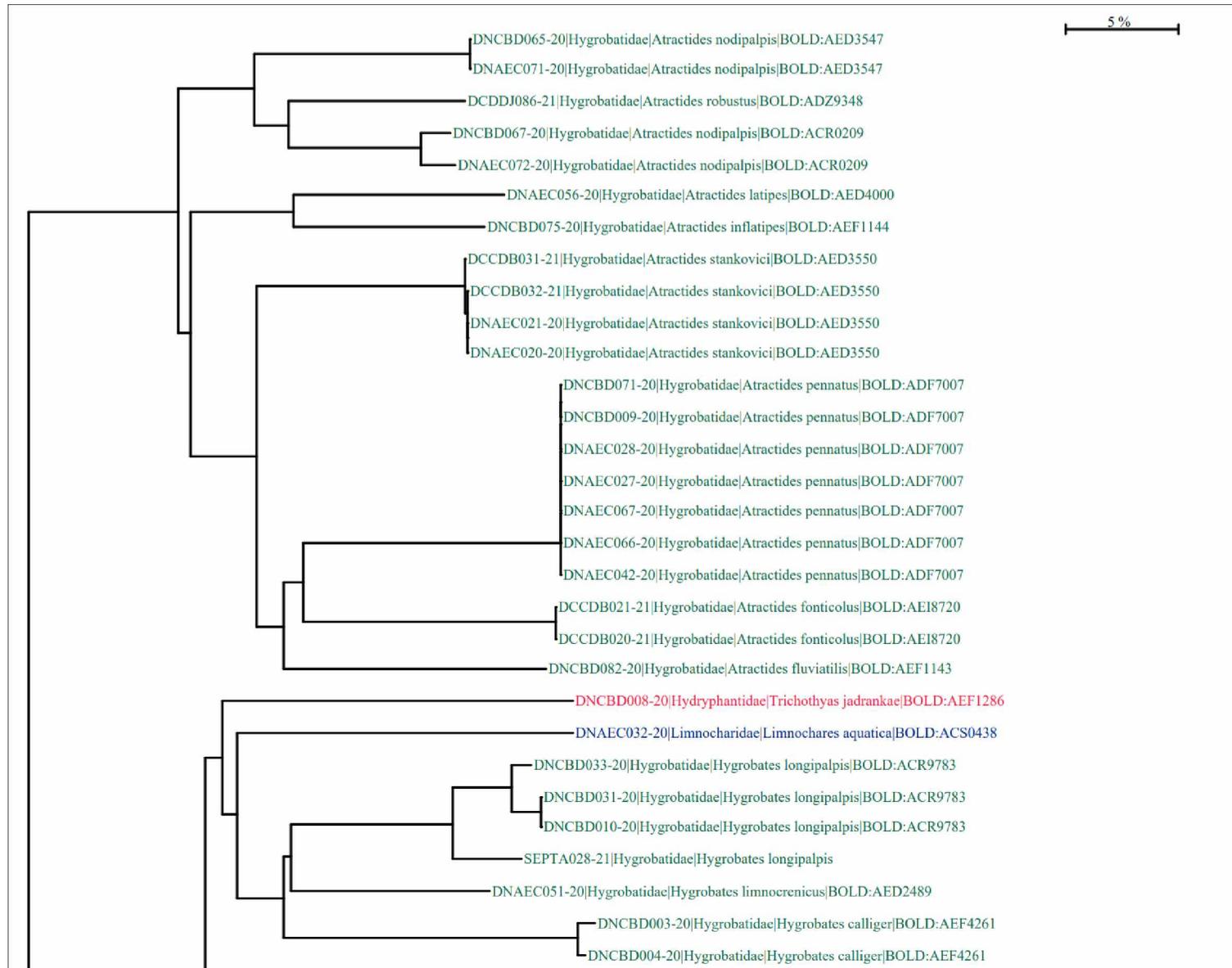
U ovom filogenetskom stablu porodice Oxidae i Limnesiidae sa po jednom vrstom, predstavljene su kao sestrinske. *Oxus angustipositus* i *Limnesia undulata* jedine su vrste vodenih grinja iz ovih porodica u slivu Skadarskog jezera.

Porodica Pionidae je monofiletska, odvaja 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*.

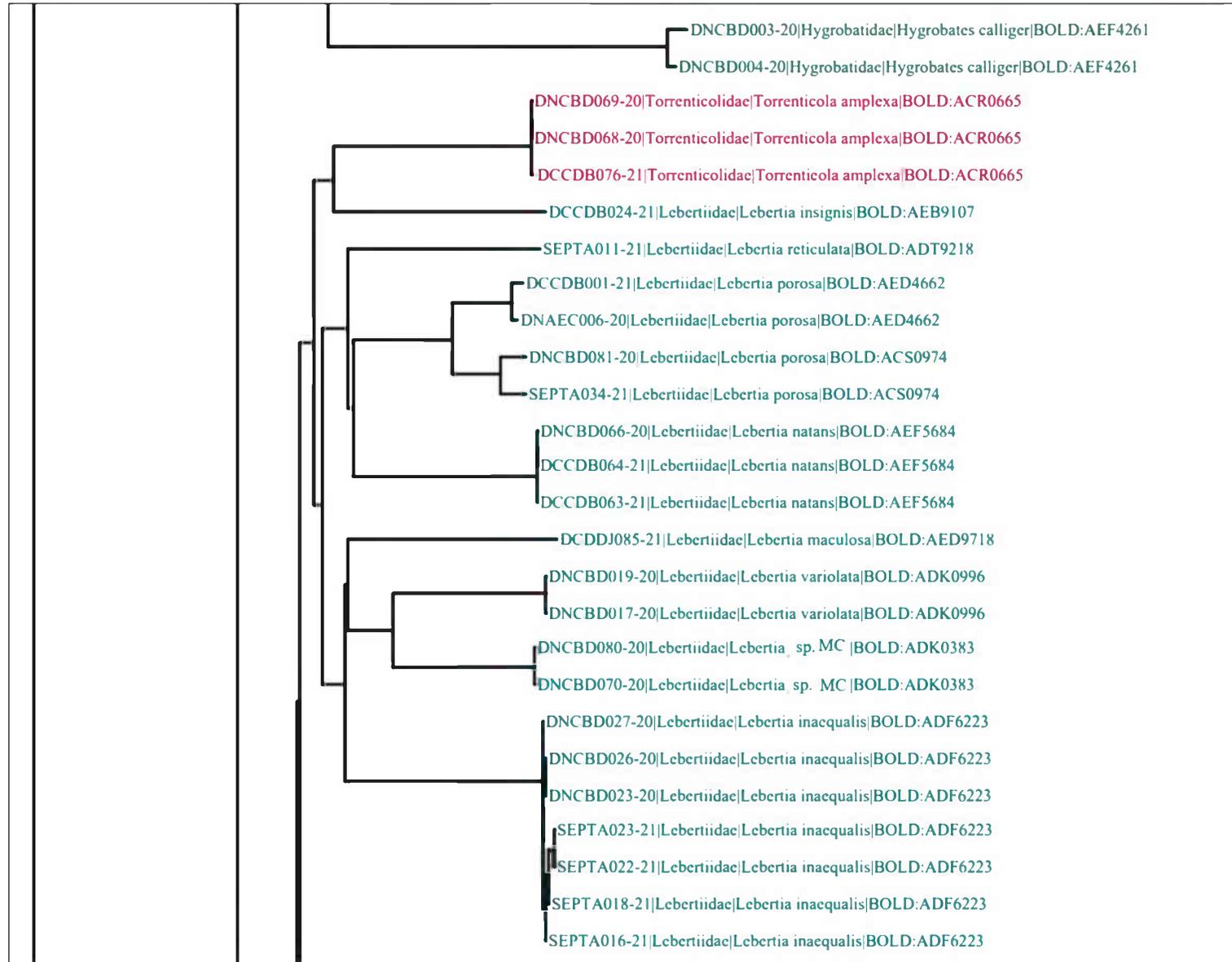
Porodica Unionicolidae razdvaja se u dvije linije. Vrsta *Neumania limosa* je sestrinska vrstama iz porodice Pionidae. Preostale vrste iz porodice Unionicolidae - *Neumania imitata*, *Unicola minor* i *Unicola ypsilophora* - grupišu se sa vrstama porodica Aturidae i Wettinidae. Naime, ove tri vrste predstavljaju 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).



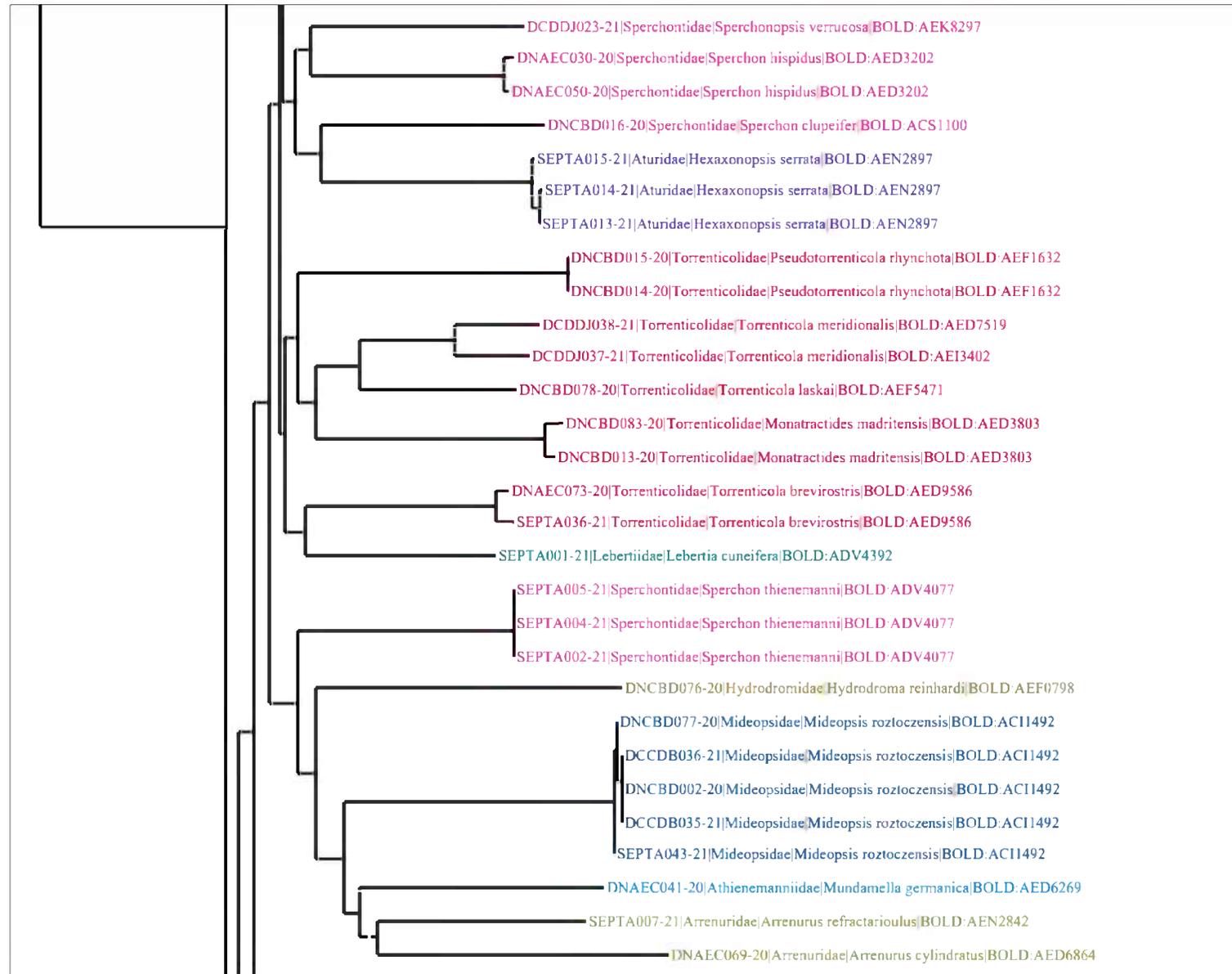
Slika 37, 1. dio

Filogenetsko stablo vodenih grinja u slivu Skadarskog jezera, konstruisano metodom susjednog sparivanja na osnovu mitondrijskog *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.



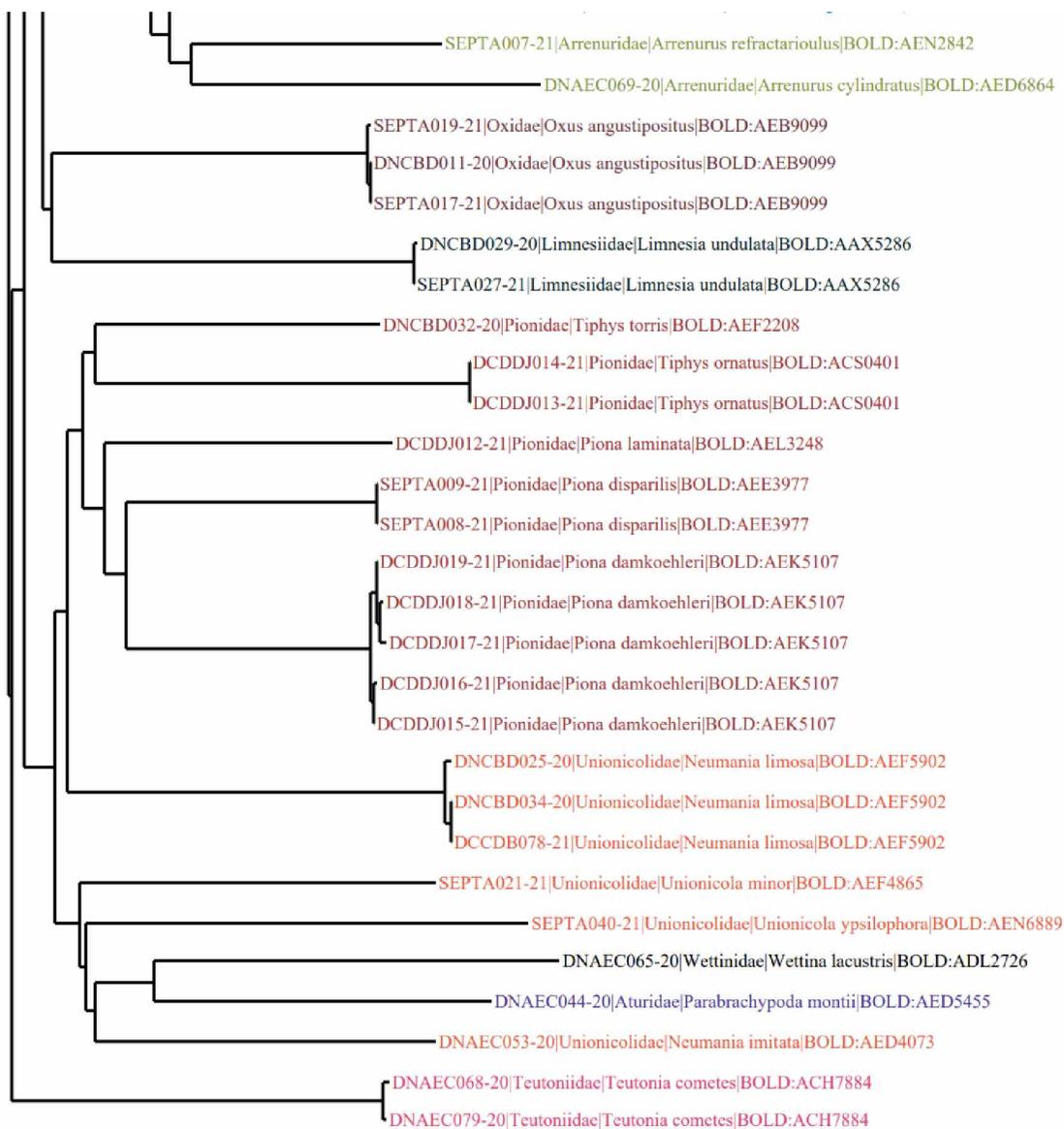
Slika 37, 2. dio

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 mitondrijskog *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. Zvjezdicom (*) su označene vrste koje se navode u radu Zawal & Pešić (2018).

Br.	Naziv taksona	ID jedinke	Lokalitet (grad, tačna lokacija)	Koordinate	BOLD / GenBank ID	BIN (Barcode Index Number)
Limnocharidae						
1	<i>Limnochares aquatica</i>	31. CG2020_6 _C10	Podgorica, rijeka Zeta, Pričelje	42.5022N, 19.2225E	DNAEC032- 20/OL870272	BOLD:ACS0438
Hydryphantidae						
2	<i>Trichothyas jadranae</i> *	CCDB- 3867-A08	Bar, Poseljani, Poseljanski potok	42.3095N, 19.0557E	DNCBD008- 20/OL870193	BOLD:AEF1286
Hydrodromidae						
3	<i>Hydrodroma reinhardi</i>	CCDB- 3867-G04	Tuzi, rijeka Cijevna, Dinoša	42.4057N, 19.3569E	DNCBD076- 20/OL870294	BOLD:AEF0798
Lebertiidae Thor, 1900						
4	<i>Lebertia maglioi</i> (<i>Lebertia</i> sp. 2MC)	CCDB- 3867-G08	Tuzi, rijeka Cijevna, Dinoša	42.4057N, 19.3569E	DNCBD080- 20/OL870270	BOLD:ADK0383
5		CCDB- 3867-F10	Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	42.5542N, 19.1059E	DNCBD070- 20/OL870167	
6	<i>Lebertia cuneijera</i>	CCDB- 38363 A01	Nikšić, planina Lukavica, izvor Babino Sicelo	42.8043N, 19.2152E	SEPTA001- 21/OL870208	BOLD:ADV4392
7	<i>Lebertia variolata</i>	CCDB- 3867-B05	Bar, potok u selu Godinje	42.2206N, 19.1118E	DNCBD017- 20/OL870247	

Br.	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	<i>Lebertia natans</i>	CCDB382 33 F03	Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	42.5541N, 19.1057E	DCCDB063- 21/OL870091	BOLD:AEF5684
10		CCDB382 33 F04	Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	42.5541N, 19.1057E	DCCDB064- 21/OL870275	
11		CCDB- 3867-F06	Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	42.5542N, 19.1059E	DNCBD066- 20/OL870162	
12	<i>Lebertia inaequalis</i> *	CCDB- 3867-C03	Tuzi, Vitoja, bazen	42.324N, 19.3637E	DNCBD027- 20/OL870246	BOLD:AEF5913
13		CCDB- 3867-B11	Tuzi, Vitoja, bazen	42.324N, 19.3637E	DNCBD023- 20/OL870155	BOLD:ADF6223
14		CCDB- 3867-C02	Tuzi, Vitoja, bazen	42.324N, 19.3637E	DNCBD026- 20/OL870146	
15		CCDB 38363 B04	Bar, Skadarsko jezero, Murići	42.1637N, 19.2214E	SEPTA016- 21/OL870271	
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	

Br.	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	<i>Lebertia insignis</i>	CCDB- 38233 B12	Danilovgrad, rijeka Zeta, Slap	42.6001N, 19.0656E	DCCDB024- 21/OL870127	BOLD:AEB9107
20	<i>Lebertia maculosa</i>	CCDB 38361 HO1	Kolašin, izvor kod Manastira Morača	42.7668N, 19.3906E	DCDDJ085- 21/OL870181	BOLD:AED9718
21	<i>Lebertia porosa</i> *	CCDB- 3867-G09	Tuzi, rijeka Cijevna, Dinoša	42.4057N, 19.3569E	DNCBD081- 20/OL870224	BOLD:ACS0974
22		CCDB- 38363 C10	Cetinje, Rijeka Crnojevića	42.3557N, 19.0228E	SEPTA034- 21/OL870153	
23		CCDB- 38233 A01	Podgorica, izvor Mareza	42.4801N, 19.1822E	DCCDB001- 21/OL870200	BOLD:AED4662
24		7. CG2020_1 0	Tuzi, Vitoja izvor	42.3254N, 19.3628E	DNAEC006- 20/OL870262	
25	<i>Lebertia reticulata</i>	CCDB 38363 A11	Nikšić, izvor Vukovo vrelo	42.8574N, 18.9426E	SEPTA011- 21/OL870303	BOLD:ADV4392
Oxidae						
26	<i>Oxus angustipositus</i> *	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	

Br.	Naziv taksona	ID jedinke	Lokalitet (grad, tačna lokacija)	Koordinate	BOLD / GenBank ID	BIN (Barcode Index Number)
28		CCDB 38363 B07	Bar, Skadarsko jezero, Murići	42.1637N, 19.2214E	SEPTA019- 21/OL870215	
Teutoniidae Koenike, 1910						
29	<i>Teutonia cometes</i> *	33. M19_20_3 _F11	Podgorica, Mareza kanal	42.479N, 19.1813E	DNAEC068- 20/OL870142	BOLD:ACH7884
30		Hyd_MN_ VP5	Danilovgrad, izvor Svinjiška vrela	42.6384N, 19.0074E	DNAEC079- 20/OL870180	
Sperchontidae						
31	<i>Sperchon clupeifer</i> *	CCDB- 3867-B04	Bar, potok u selu Godinje	42.2206N, 19.1118E	DNCBD016- 20/OL870218	BOLD:ACS1100
32	<i>Sperchon hispidus</i>	12. M19 29A 8_E3	Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuz	42.5113N, 19.1982E	DNAEC050- 20/OL870144	BOLD:AED3202
33		29. CG2020_7 _C8C7	Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuz	42.5113N, 19.1982E	DNAEC030- 20/OL870170	
34	<i>Sperchon thienemanni</i>	CCDB 38363 A02	Nikšić, planina Lukavica, izvor Babino sicelo	42.8043N, 19.2152E	SEPTA002- 21/OL870228	BOLD:ADV4077
35		CCDB 38363 A04	Nikšić, lanina Lukavica, izvor Babino sicelo	42.8043N, 19.2152E	SEPTA004- 21/OL870149	
36		CCDB 38363 A05	Nikšić, planina Lukavica,	42.8043N, 19.2152E	SEPTA005- 21/OL87092	

Br.	Naziv taksona	ID jedinke	Lokalitet (grad, tačna lokacija)	Koordinate	BOLD / GenBank ID	BIN (Barcode Index Number)
			izvor Babino sicelo			
37	<i>Sperchonopsis verrucosa</i>	CCDB 38361 B11	Cetinje, izvor “Smokov vijenac”	42.254N, 18.9902E	DCDDJ023- 21/ OL870266	BOLD:AEK8297
Torrenticolidae						
38	<i>Monatractides madritensis</i>	CCDB- 3867-G11	Tuzi, 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	<i>Torrenticola amplexa</i> *	CCDB- 3867-F08	Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	42.5542N, 19.1059E	DNCBD068- 20/ OL870086	BOLD:ACR0665
41		CCDB- 3867-F09	Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	42.5542N, 19.1059E	DNCBD069- 20/ OL870109	
42		CCDB382 33 G04	Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	42.5542N, 19.1059E	DCCDB076- 21/ OL870281	
43	<i>Torrenticola brevirostris</i>	42. M19_29A _5_G6	Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuš	42.5113N, 19.1982E	DNAEC073- 20/ OL87095	BOLD:AED9586
44		CCDB 38363 C12	Podgorica, Morača, Podgorica	42.4368N, 19.2559E	SEPTA036- 21/ OL870263	
45	<i>Torrenticola laskai</i>	CCDB- 3867-G06	Tuzi, rijeka Cijevna, Dinoša	42.4057N, 19.3569E	DNCBD078- 20/ OL870197	BOLD:AEF5471

Br.	Naziv taksona	ID jedinke	Lokalitet (grad, tačna lokacija)	Koordinate	BOLD / GenBank ID	BIN (Barcode Index Number)
46	<i>Torrenticola meridionalis</i>	CCDB- 3867-G02	Bar, rijeka Orahovštica	42.2476N, 19.0798E	DNCBD074- 20/ OL870233	BOLD:AED7519
47		CCDB- 3867-G01	Bar, rijeka Orahovštica	42.2476N, 19.0798E	DNCBD073- 20/ OL870095	
48	<i>Pseudotorrenticol a rhynchota</i>	CCDB- 3867-B02	Bar, potok u selu Godinje	42.2206N, 19.1118E	DNCBD014- 20/ OL870108	BOLD:AEF1632
49		CCDB- 3867-B03	Bar, potok u selu Godinje	42.2206N, 19.1118E	DNCBD015- 20/ OL870102	
Limnesiidae						
50	<i>Limnesia undulata</i> *	CCDB- 3867-C05	Tuzi, Vitoja, bazen	42.324N, 19.3637E	DNCBD029- 20/ OL870238	BOLD:AAX5286
51		CCDB- 38363- C03	Tuzi, Skadarsko jezero, Podhum	42.3139N, 19.3534E	SEPTA027- 21/ OL870238	
Hygrobatidae						
52	<i>Atractides fluviatilis</i>	CCDB- 3867-G10	Tuzi, rijeka Cijevna, Dinoša	42.4057N, 19.3569E	DNCBD082- 20/OL870238	BOLD:AEF1143
53	<i>Atractides inflatipes</i>	CCDB- 3867-G03	Bar, Orahovštica potok	42.2476N, 19.0798E	DNCBD075- 20/OL870205	BOLD:AEF1144
54	<i>Atractides fonticolus</i>	CCDB382 33 B09	Podgorica, Pričelje, izvor Studenac	42.4835N, 19.2429E	DCCDB021- 21/OL870291	BOLD:AEI8720
55		CCDB382 33 B08	Podgorica, Pričelje, spring Studenac	42.4835N, 19.2429E	DCCDB020- 21/OL870079	

Br.	Naziv taksona	ID jedinke	Lokalitet (grad, tačna lokacija)	Koordinate	BOLD / GenBank ID	BIN (Barcode Index Number)
56	<i>Atractides nodipalpis</i> *	CCDB- 3867-F07	Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	42.5542N, 19.1059E	DNCBD067- 20/OL870084	BOLD:ACR0209
57		41. M19_29A _1_G5	Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž	42.5113N, 19.1982E	DNAEC072- 20/OL870210	
58		CCDB- 3867-F05	Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	42.5542N, 19.1059E	DNCBD065- 20/OL870165	BOLD:AED3547
59	40. M19_29A _1_G4	Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž	42.5113N, 19.1982E	DNAEC071- 20/OL870145		
60	<i>Atractides pennatus</i>	CCDB- 3867-F11	Bar, rijeka Orahovštica	42.2476N, 19.0798E	DNCBD071- 20/OL870283	BOLD:ADF7007
61		CCDB- 38679-A09	Bar, Poseljani, Poseljanski potok	42.3057N, 19.0557E	DNCBD009- 20/OL870150	
62		25. CG2020_9 _C6	Podgorica, Mareza, izvor	42.4801N, 19.1821E	DNAEC028- 20/OL870135	
63		23. CG2020_9 _C5	Podgorica, Mareza, izvor	42.4801N, 19.1821E	DNAEC027- 20/OL870285	
64		32. M19_23_1 _F10	Nikšić, Vidrovan, Vukovo vrelo, izvor	42.8575N, 18.9414E	DNAEC067- 20/OL870230	
65		31. M19_23_1 _F9	Nikšić, Vidrovan, Vukovo vrelo, izvor	42.8575N, 18.9414E	DNAEC066- 20/OL870126	

Br.	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	<i>Atractides robustus</i>	CCDB 38361 H02	Kolašin, izvor Manastir Morača	42.7668N, 19.3906E	DCDDJ086- 21/OL870295	BOLD:ADZ9348
68	<i>Atractides latipes</i>	18. M19_08B_ 7_E9	Tuzi, rijeka Cijevna, Trgaja	42.3964N, 19.3798E	DNAEC056- 20/OL870105	BOLD:AED4000
69	<i>Atractides stankovici</i>	CCDB382 33 C08	Danilovgrad, rijeka Zeta, Slap	42.6001N, 19.0656E	DCCDB032- 21/OL870245	BOLD:AED3550
70		CCDB382 33 C07	Danilovgrad, rijeka Zeta, Slap	42.6001N, 19.0656E	DCCDB031- 21/OL870189	
71		13. CG2020_4 B10	Podgorica, Mareza, kanal	42.479N, 19.1813E	DNAEC020- 20/OL870242	
72		14. CG2020_4 B11	Podgorica, Mareza, kanal	42.479N, 19.1813E	DNAEC021- 20/OL870231	
73	<i>Hygrobates calliger</i>	CCDB- 38679-A04	Bar, Poseljani, Poseljski izvor	42.3095N, 19.0518E	DNCBD004- 20/OL870089	BOLD:AEF4261
74		CCDB- 38679-A03	Bar, Poseljani, Poseljski izvor	42.3095N, 19.0518E	DNCBD003- 20/OL870083	
75	<i>Hygrobates limnocrenicus</i>	13. M19_20_5 _E4	Podgorica, Mareza kanal	42.479N, 19.1813E	DNAEC051- 20/OL870173	BOLD:AED2489

Br.	Naziv taksona	ID jedinke	Lokalitet (grad, tačna lokacija)	Koordinate	BOLD / GenBank ID	BIN (Barcode Index Number)
76	<i>Hygrobates longipalpis</i> *	CCDB- 3867-C07	Tuzi, Vitoja, bazen	42.324N, 19.3637E	DNCBD031- 20/OL870073	BOLD:ACR9783
77		CCDB- 3867-C09	Tuzi, Vitoja, bazen	42.324N, 19.3637E	DNCBD033- 20/OL870265	
78		CCDB- 38679-A10	Bar, Poseljani, Poseljski izvor	42.3057N, 19.0518E	DNCBD010- 20/OL870190	
79		CCDB 38363 C04	Tuzi, Skadarsko jezero, Podhum	42.3139N, 19.3534E	SEPTA028- 21/OL870297	N/N
Unionicolidae						
80	<i>Neumania imitata</i>	15. M19_29C_ 2_E6	Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž	42.5113N, 19.1982E	DNAEC053- 20/OL870108	BOLD:AED4073
81	<i>Neumania limosa</i> *	CCDB- 3867-C10	Tuzi, Vitoja, bazen	42.324N, 19.3637E	DNCBD034- 20/OL870251	BOLD:AEF5902
82		CCDB- 3867-C01	Tuzi, Vitoja, bazen	42.324N, 19.3637E	DNCBD025- 20/OL870088	
83		CCDB382 33 G06	Tuzi, Vitoja, bazen	42.324N, 19.3637E	DCCDB078- 21/OL870187	
84	<i>Unionicola minor</i> *	CCDB 38363 B09	Tuzi, Vitoja, bazen	42.324N, 19.3637E	SEPTA021- 21/OL870255	BOLD:AEF4865
85	<i>Unionicola ypsilophora</i>	CCDB 38363 D04	Cetinje, Rijeka Crnojevića (<i>Anodonta exulcerata</i>)	42.3546N, 19.0286E	SEPTA040- 21/OL870236	BOLD:AEN6889
86		CCDB 38361 B03	Danilovgrad, bara Moromiš	42.5322N, 19.1993E	DCDDJ015- 21/OL870134	BOLD:AEK5107

Br.	Naziv taksona	ID jedinke	Lokalitet (grad, tačna lokacija)	Koordinate	BOLD / GenBank ID	BIN (Barcode Index Number)
87	<i>Piona damkoehleri</i>	CCDB 38361 B04	Danilovgrad, bara, Moromiš	42.5322N, 19.1993E	DCDDJ016- 21/OL870124	
88		CCDB 38361 B05	Danilovgrad, bara, Moromiš	42.5322N, 19.1993E	DCDDJ017- 21/OL870288	
89		CCDB 38361 B06	Danilovgrad, bara, Moromiš	42.5322N, 19.1993E	DCDDJ018- 21/OL870243	
90		CCDB 38361 B07	Danilovgrad, bara, Moromiš	42.5322N, 19.1993E	DCDDJ019- 21/OL870141	
91	<i>Piona laminata</i>	CCDB 38361 A12	Danilovgrad, bara, Moromiš	42.5322N, 19.1993E	DCDDJ012- 21/OL870154	BOLD:AEL3248
92	<i>Piona disparilis</i> *	CCDB 38363 A08	Nikšić, izvor Vukovo vrelo, bazen	42.8577N, 18.9416E	SEPTA008- 21/OL870284	BOLD:AEE3977
93		CCDB 38363 A09	Nikšić, izvor Vukovo vrelo, bazen	42.8577N, 18.9416E	SEPTA009- 21/OL870114	
94	<i>Typhis torris</i> *	CCDB- 3867-C08	Tuzi, Vitoja, bazen	42.324N, 19.3637E	DNCBD032- 20/OL870176	BOLD:AEF2208
95	<i>Typhis ornatus</i>	CCDB 38361 B01	Danilovgrad, bara, Moromiš	42.5322N, 19.1993E	DCDDJ013- 21/OL870159	BOLD:ACS0401
96		CCDB 38361 B02	Danilovgrad, bara, Moromiš	42.5322N, 19.1993E	DCDDJ014- 21/OL870264	
Wettinidae						
97	<i>Wettina lacustris</i>	30. M19_20_4 _F8	Podgorica, Mareza, kanal	42.479N, 19.1813E	DNAEC065- 20/OL870165	BOLD:ADL2726
Mideopsidae						

Br.	Naziv taksona	ID jedinke	Lokalitet (grad, tačna lokacija)	Koordinate	BOLD / GenBank ID	BIN (Barcode Index Number)
98	<i>Mideopsis roztoczensis</i> *	CCDB- 38679-A02	Bar, Poseljani, Poseljski izvor	42.3095N, 19.0518E	DNCBD002- 20/OL870166	BOLD:ACI1492
99		CCDB- 3867-G05	Tuzi, rijeka Cijevna, Dinoša	42.4057N, 19.3569E	DNCBD077- 20/OL870298	
100		CCDB382 33 C12	Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž	42.5112N, 19.1991E	DCCDB036- 21/OL870179	
101		CCDB382 33 C11	Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž	42.5112N, 19.1991E	DCCDB035- 21/OL870122	
102		CCDB 38363 D07	Danilovgrad, rijeka Zeta, Vranjske Njive	42.4683N, 19.2579E	SEPTA043- 21/OL870110	
Athienemanniidae						
103	<i>Mundamella germanica</i>	1. KIA_20B_ D6	Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž	42.5113N, 19.1982E	DNAEC041- 20/OL870286	BOLD:AED6269
Aturidae						
104	<i>Hexaxonopsis serrata</i> *	CCDB 38363 B01	Bar, Skadarsko jezero, Murići	42.1637N, 19.2214E	SEPTA013- 21/OL870209	BOLD:AEN2897
105		CCDB 38363 B02	Bar, Skadarsko jezero, Murići	42.1637N, 19.2214E	SEPTA014- 21/OL870132	
106		CCDB 38363 B03	Bar, Skadarsko jezero, Murići	42.1637N, 19.2214E	SEPTA015- 21/OL870163	

Br.	Naziv taksona	ID jedinke	Lokalitet (grad, tačna lokacija)	Koordinate	BOLD / GenBank ID	BIN (Barcode Index Number)
107	<i>Parabrachypoda montii</i>	5. M19_20_6 _D9	Podgorica, Mareza, kanal	42.479N, 19.1813E	DNAEC044- 20/OL870174	BOLD:AED5455
Arrenuridae						
108	<i>Arrenurus cylindratus</i> *	34. M19_20_1 _F12	Podgorica, Mareza, kanal	42.479N, 19.1813E	DNAEC069- 20/OL870239	BOLD:AED6864
109	<i>Arrenurus refractarioulus</i>	CCDB 38363 A07	Nikšić, planina Lukavica, bare	42.8118N, 19.1872E	SEPTA007- 21/OL870158	BOLD:AEN2842

3.2.5. Filogenetski odnosi vodenih grinja roda *Atractides*

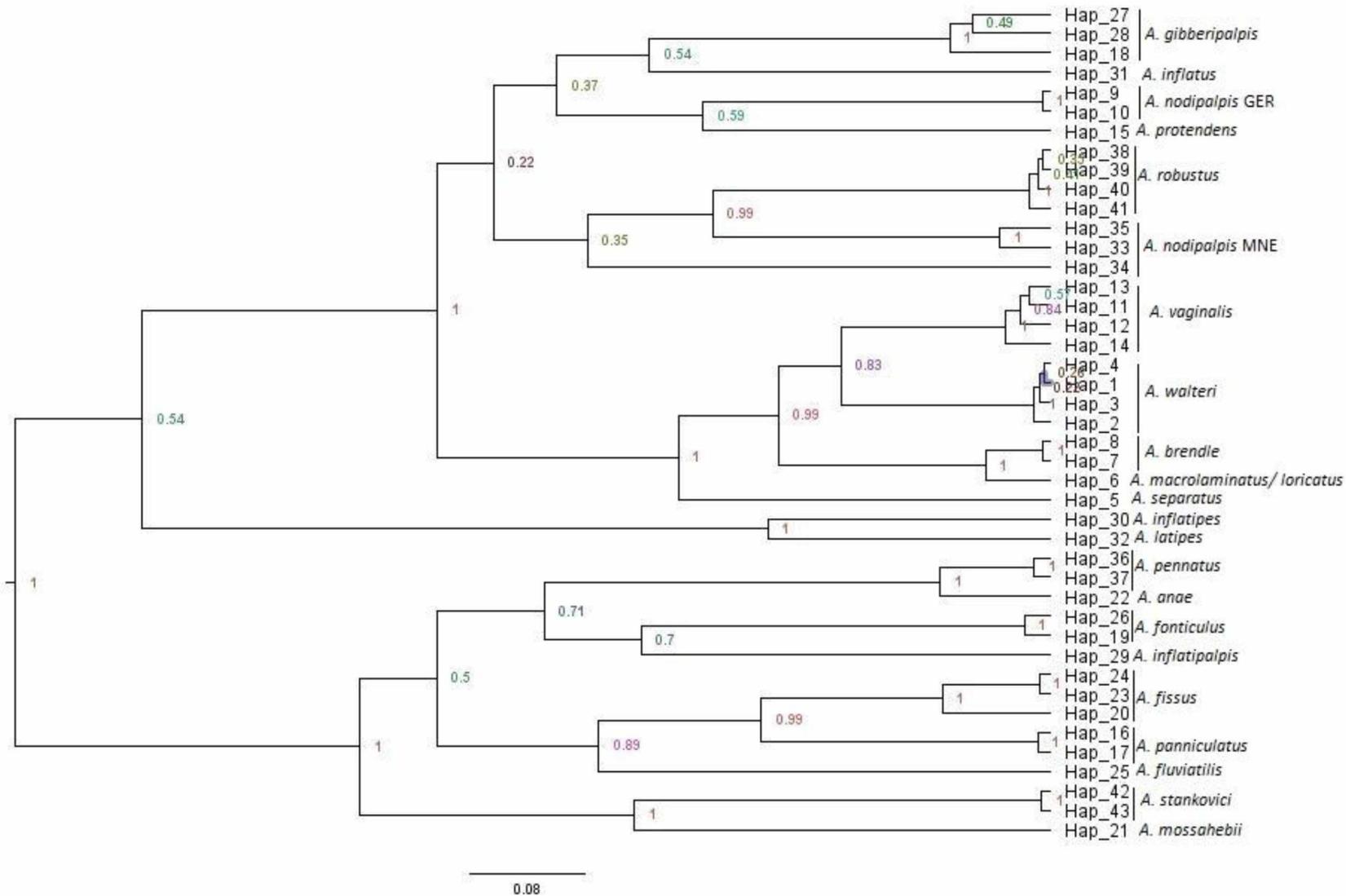
Za detaljniju rekonstrukciju filogenetskih odnosa vodenih grinja odabran je rod *Atractides*, koji je drugi najbrojniji rod u ovoj disertaciji. Osim DNK barkodova iz Crne Gore, u filogenetsku analizu uključeni su *COI* barkodovi iz Austrije, Italije, Njemačke, Švajcarske i Irana (prilog 3). Konačni set sređenih 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, varijabilna 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 poznatu vrstu *Atractides*, uključujući nedavno opisanu novu vrstu za nauku - *Atractides anae* (sa područja Crne Gore i Bugarske). Od 13 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 sestrinske (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 najsirodnije 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. mossahebbii* predstavlja odvojeni klaster.



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 i sar. (2019) i podacima iz disertacije (tabela 17. i prilog 3).

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 detektovana su 44 različita haplotipa u analiziranom setu podataka, uključujući haplotip *Hygrobates marezaensis*, kao outgrupe (tabele 16. i 17).

Tabela 16: Osnovni parametri genetičkog diverziteta populacija vodenih grinja roda *Atractides*

N (broj uzoraka)	Nh (broj različitih haplotipova)	Hd (diverzitet haplotipova)	π (diverzitet nukleotida)	k (prosječan broj nukleotidnih razlika)	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) (prilog 3).

Diverzitet *COI* haplotipova iznosio je $Hd = 0.975$. U okviru 74 *COI* sekvenci bilo je 217 polimorfnih 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 vrsta *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. mossahabii* i *A. protendens*). Haplotipove vrste *A.*

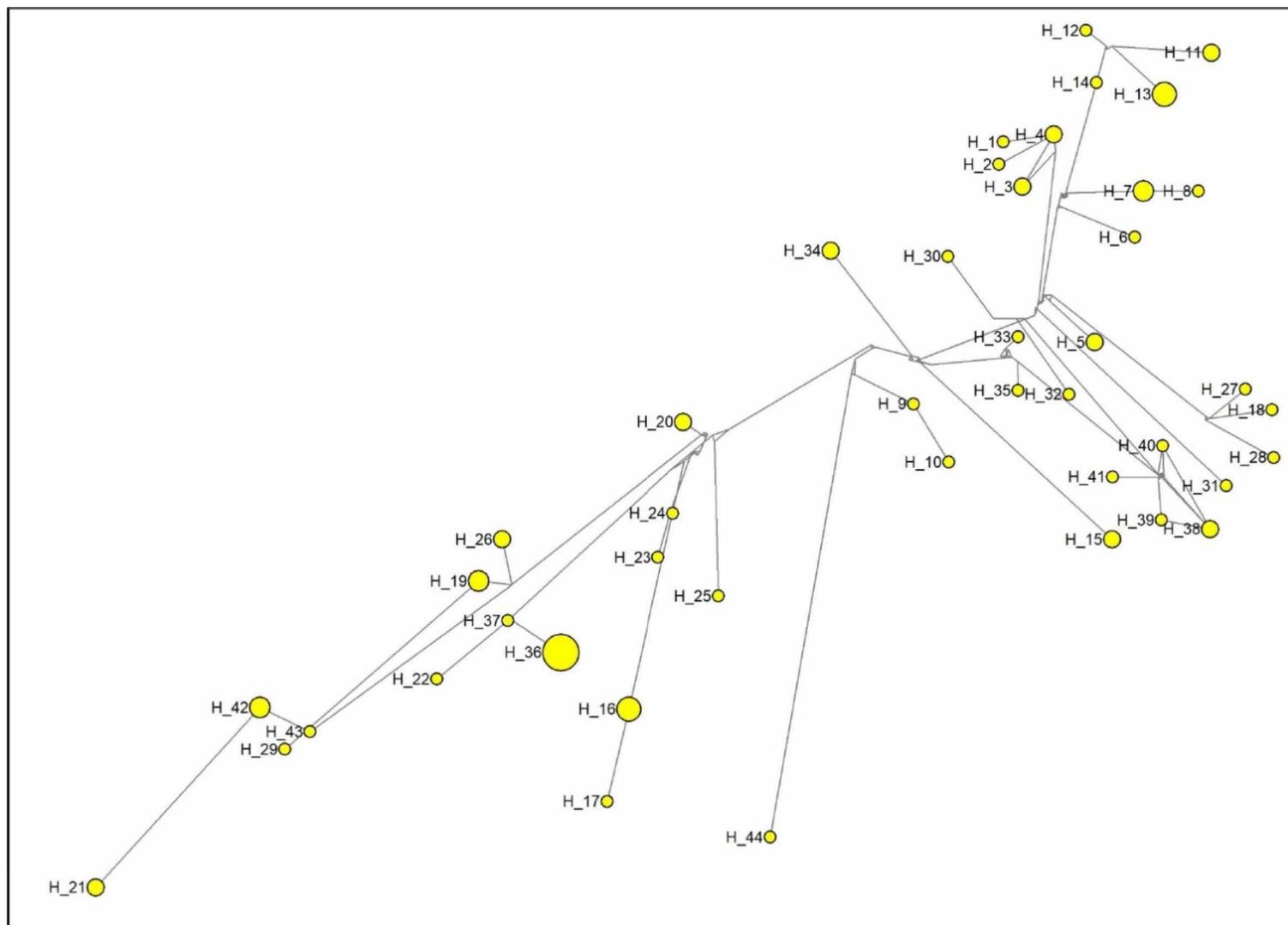
nodipalpis iz Njemačke i Crne Gore razdvaja veliki broj mutacijskih koraka (slika 39). Znatno manji broj mutacijskih koraka razdvaja haplotipove *A. fissus* iz Austrije (Hap_20) i Crne Gore (Hap_23 i Hap_24) (slika 39), kao i haplotipove *A. gibberipalpis* iz Njemačke (Hap_18) i Crne Gore (Hap_27 i Hap_28). 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	<i>Atractides walteri</i> AUS	Hap_1	MK889691
2	<i>Atractides walteri</i> AUS	Hap_2	MK889682
3	<i>Atractides walteri</i> AUS	Hap_3	MK889636; MK889685
4	<i>Atractides walteri</i> AUS	Hap_4	MK889681; MK889683
5	<i>Atractides separatus</i> AUS/GER	Hap_5	MK889637; MK889602
6	<i>Atractides macrolaminatus/loricatus</i> grupa AUS	Hap_6	MK889686
7	<i>Atractides brendle</i> GER	Hap_7	MK889750; MK889742; MK889741
8	<i>Atractides brendle</i> GER	Hap_8	MK889749
9	<i>Atractides nodipalpis</i> GER	Hap_9	MK889743;
10	<i>Atractides nodipalpis</i> GER	Hap_10	MK889744
11	<i>Atractides vaginalis</i> GER/SW	Hap_11	MK889603; MK889540
12	<i>Atractides vaginalis</i> IT	Hap_12	MK889572
13	<i>Atractides vaginalis</i> SW	Hap_13	MK889543; MK889539; MK889531
14	<i>Atractides vaginalis</i> SW	Hap_14	MK889532
15	<i>Atractides protendens</i> GER	Hap_15	MK889645; MK889646
16	<i>Atractides panniculatus</i> GER	Hap_16	MK889653; MK889652; MK889651; MK889650

17	<i>Atractides panniculatus</i> GER	Hap 17	MK889649
18	<i>Atractides gibberipalpis</i> GER	Hap 18	MK889727
19	<i>Atractides fonticulus</i> GER	Hap_19	MK889711; MK889710; MK889709
20	<i>Atractides fissus</i> AUS	Hap_20	MK889707; MK889706
21	<i>Atractides mossahebi</i> IR	Hap_21	OM321057; OM321065
22	<i>Atractides anae</i> MN	Hap 22	OL870229
23	<i>Atractides fissus</i> MN	Hap 23	OL870148
24	<i>Atractides fissus</i> MN	Hap 24	OL870296
25	<i>Atractides fluviatilis</i> MN	Hap 25	OL870211
26	<i>Atractides fonticulus</i> MN	Hap_26	OL870291; OL870079
27	<i>Atractides gibberipalpis</i> MN	Hap 27	OL870111
28	<i>Atractides gibberipalpis</i> MN	Hap 28	OL870115
29	<i>Atractides inflatipalpis</i> MN	Hap 29	OL870164
30	<i>Atractides inflatipes</i> MN	Hap 30	OL870205
31	<i>Atractides inflatus</i> MN	Hap 31	OL870097
32	<i>Atractides latipes</i> MN	Hap 32	OL870105
33	<i>Atractides nodipalpis</i> MN	Hap 33	OL870084
34	<i>Atractides nodipalpis</i> MN	Hap_34	OL870182; OL870145
35	<i>Atractides nodipalpis</i> MN	Hap 35	OL870210
36	<i>Atractides pennatus</i> MN	Hap_36	OL870283; OL870150; OL870135; OL870285; OL870230; OL870126; OL870206; OL870274; OL870260;
37	<i>Atractides pennatus</i> MN	Hap 37	OL870138
38	<i>Atractides robustus</i> MN	Hap_38	OL870295; OL870178;
39	<i>Atractides robustus</i> MN	Hap 39	OL870094
40	<i>Atractides robustus</i> MN	Hap 40	OL870301
41	<i>Atractides robustus</i> MN	Hap 41	OL870212
42	<i>Atractides stankovici</i> MN	Hap_42	OL870245; OL870231; OL870242
43	<i>Atractides stankovici</i> MN	Hap 43	OL870189
44	<i>Hygrobates marezaensis</i>	Hap 44	N/A



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.

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.

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 vrijeme pisanja ove disertacije, od ukupno 252 javno dostupna DNK barkoda vodenih grinja sa područja Crne Gore u BOLD bazi, 232 barkoda rezultat su nedavno formiranog seta podataka "MNEHYD".

Našim istraživanjem znatno je povećan broj DNK barkod sekvenci iz Crne Gore i samim tim, olakšan nastavak korišćenja ove metode u procesima određivanja vrsta pijavica i vodenih grinja.

Zahvaljujući istoj metodi, 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: *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. Registrovane su *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 i sar.2020, *Hygrobates lacrima* Pešić 2020, *Hygrobates limnocrenicus* Pešić 2020, *Hygrobates mediterraneus* Pešić 2020, *Mideopsis milankovici* Pešić & Smith, 2020 i *Sperchon milisai* Pešić 2021 (Pešić i sar. 2020a, Pešić i sar. 2020b, Pešić i sar. 2020c, Pešić i sar. 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*. Korišćenjem 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 poznate 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 sugerira 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 i sar. (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 i sar. 2005), koje su označene kao *G. verrucata*, u našem filogenetskom stablu čine dio klade *G. cf. nebulosa*. Na navedeno su ukazali Kaygorodova i sar. (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 i sar. (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, objavljene pod imenom *G. verrucata*, nedostaju podaci o morfološkim karakteristikama korišćenim 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, čime se dovodi 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 kladu koja sadrži jedinke sa Balkana. Ovo ukazuje na dugogodišnju izolaciju između populacija iz sjeverno-centralne Evrope i jugoistočne Evrope. Grosser i sar. (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 neočekivani rezultat odnosi se

na *G. complanata* i *G. balcanica* - srednja K2P interspecifična distanca između *G. balcanica*, endema kojeg su opisali Grosser i sar. (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 i sar. 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 i sar. 2017) ili procjene relativno velike „barkoding praznine“ vrsta koje su se relativno skoro razdvojile (Kvist i sar. 2010). Prema Puillandre i sar. (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 mnoštva sekvenci *G. complanata*. Na kraju, kao što je nedavno naglašeno od strane Puillandre i sar. (2021), pri konačnom razdvajanju vrsta treba uzeti u obzir i ostale karaktere, a ne isključivo granične vrijednosti sa najboljim ASAP rezultatom.

Dobijena „barkoding praznina“ od 4 do 8% K2P u našem analiziranom setu podataka, može se uporediti sa rezultatima rada Kaygorodova i sar. (2020) od 5 do 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 beskičmenjaka 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 i sar. (2022), u javnim bazama podataka do 2019. godine bili su dostupni podaci za samo 3% poznatih vrsta (203 su barkodirane). Glavni nedostatak javno dostupnih baza podataka je taj što 90% jedinki vodenih grinja nije identifikovano do nivoa vrsta (Paláez i sar. 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. 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 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 u klade koje odgovaraju prethodno poznatim vrstama. Pomoću mrežne analize haplotipova, u ovom setu podataka, registrovana su 43 haplotipa, koji podržavaju rezultate filogenetičke analize.

Sa druge strane, kao što je istaknuto u studiji Blattner i sar. (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. Ovaj stav potvrđen 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 dovoljno 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 i sar. 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 i sar. (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 i sar. 2013, García-Jiménez i sar. 2017, Pešić i sar. 2017).

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 i sar. 2010, Stålstedt i sar. 2013, Blattner i sar. 2019).

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 Palearktika, 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 Palearktiku, 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 - iz Holandije, Poljske, Italije, Sjeverne 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 Holarktika (Gerecke, 2009, Di Sabatino i sar. 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 je u ovom setu podataka prisutan sa dva klastera. Intraspecifična K2P distanca koja razdvaja klastere 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 Holarktiku (Gerecke i sar. 2016), u ovom setu podataka zastupljena je sa dva klastera. Prvi klaster (BOLD:ACS9705), u BOLD bazi podataka sadrži barkodove jedinki iz Norveške i Italije 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, naseljavaju većinom donje tokove (Pešić i sar. 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 i sar. 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 je najčešća vrsta ovog roda u Evropi, prema Gerecke i sar. (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 sa Grenlanda. Drugi klaster uključuje dvije jedinke iz Crne Gore (tabela 18). S obzirom na to da je vrijednost K2P

intraspecifične distance 18,8%, jasno je da neophodna opsežna revizija unutar ovog kompleksa vrsta.

Hygrobates calliger, široko rasprostranjena vrsta u Palearktiku (Di Sabatino i sar. 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 i sar. 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. Stålstedt i sar. (2013) ukazali su da populacija *U. minor* iz Švedske sadrži najmanje tri kriptične vrste, što sugeriše 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*” koji je dio bioinformatičke platforme u BOLD-u. Predstavljene 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, RU = Rusija, SK = Slovačka.

No	Vrsta	BIN	n	Sred. ISD	Maks. ISD	Država ¹	Najbliži BIN/Vrsta	Distanca
1.	<i>Lebertia glabra</i>	BOLD:ACR9598	2	0.8	0.8	ME, NL	BOLD:ACS0595	12.52
	<i>Lebertia glabra</i>	BOLD:ACS0595	20	0.64	1.36	NL, BG, ME, MK, IT, PL, SK	BOLD:AEJ3212	2.88
	<i>Lebertia glabra</i>	BOLD:AEI2925	3	0.64	0.96	ME	BOLD:ACO2179	12.02
2.	<i>Lebertia inaequalis</i>	BOLD:AEF5913	1	N/A	N/A	ME	BOLD:ADF6223	2.78
	<i>Lebertia inaequalis</i>	BOLD:ADF6223	18	0.18	0.34	NL, PL, ME	BOLD:AEF5913	2.78
	<i>Lebertia inaequalis</i>	BOLD:AEF2742	1	N/A	N/A	ME	BOLD:AEB4193	6.96
3.	<i>Lebertia maculosa</i>	BOLD:AED9718	3	1.27	1.6	ME, MK	BOLD:AED9197	2.76
	<i>Lebertia maculosa</i>	BOLD:AED9197	2	0.16	0.16	ME	BOLD:AED9718	2.76
4.	<i>Lebertia porosa</i>	BOLD:ACS0974	133	0.81	2.37	NL, FR, ME, DE, GB, BG, IT, PL, SK, ES, SW	BOLD:AED4662	3.89
	<i>Lebertia porosa</i>	BOLD:AED4662	12	0.14	0.85	ME	BOLD:ACS0974	3.89
5.	<i>Sperchon brevirostris</i>	BOLD:AED3857	3	0.32	0.48	ME, MK	BOLD:AEK3053	2.72
	<i>Sperchon brevirostris</i>	BOLD:ACP6107	28	0.55	3.12	NO, DE, ME	BOLD:AED3857	7.53
6.	<i>Sperchonopsis verrucosa</i>	BOLD:AEK8297	1	N/A	N/A	ME, RO	BOLD:ACS0908	4.83
	<i>Sperchonopsis verrucosa</i>	BOLD:ACS9705	9	0.29	0.97	NO, IT, ME	BOLD:ADU8190	9.83
7.	<i>Monatractides madritensis</i>	BOLD:AED3803	2	0.16	0.16	ME	BOLD:AEL3852	1.44
	<i>Monatractides madritensis</i>	BOLD:AEL3852	2	0.64	0.64	ME, SR	BOLD:AED3803	1.44
8.	<i>Torrenticola meridionalis</i>	BOLD:AED7519	8	1.46	2.25	ME, MK	BOLD:AEI3402	6.57
	<i>Torrenticola meridionalis</i>	BOLD:AEI3402	4	1.42	2.09	ME	BOLD:AEK9662	6.25
9.	<i>Torrenticola laskai</i>	BOLD:AEF5471	2	0.32	0.32	ME	BOLD:AED2306	2.17
	<i>Torrenticola laskai</i>	BOLD:AED2306	4	0.82	1.34	RS, ME, RO	BOLD:AEF5471	2.17
10.	<i>Atractides gibberipalpis</i>	BOLD:AEK7766	1	N/A	N/A	ME	BOLD:AEI3946	4.81
	<i>Atractides gibberipalpis</i>	BOLD:AEI3946	1	N/A	N/A	ME	BOLD:AEK7766	4.81
11.	<i>Atractides nodipalpis</i>	BOLD:ACR0209	41	0.59	3.05	NO, NL, GL, DE, ME, RS	BOLD:AED3548	13.3
	<i>Atractides nodipalpis</i>	BOLD:AED3547	2	0	0	ME	BOLD:AAM4306	13.3
12.	<i>Hygrobates calliger</i>	BOLD:AEF4261	2	1.2	1.2	NO, ME	BOLD:AEK4720	16.18
	<i>Hygrobates calliger</i>	BOLD:AEL5782	2	1.03	1.03	DE, ME	BOLD:AEK4720	14.61
13.	<i>Umomicola minor</i>	BOLD:AEF4865	3	0.59	0.7	ME	BOLD:ACI7165	17.02
	<i>Umomicola minor</i>	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, koji je sproveden 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 jedinice 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* korišćene 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 do 8% K2P genetičke distance prihvaćena je kao pogodna za identifikaciju vrsta roda *Glossiphonia*.

- Integrativnim pristupom analizirane su 232 jedinice vodenih grinja (Hydrachnidia) sa teritorije Crne Gore, od čega je 109 sakupljeno na području sliva Skadarskog jezera. Navedene jedinice iz sliva Skadarskog jezera čine 53 operativne taksonomske jedinice - OTU, odnosno 55 BIN-ova, u koje ih je razvojila 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*, *Parabanchypoda 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%) karakterišu 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, znatno će se ubrzati buduća istraživanja ovih grupa beskičmenjaka. Stvorena je dobra osnova da naučno-istraživačke ustanove Crne Gore nastave proces barkodiranja faune.

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 jugoslawischen Seen. Festschrift zum 60. Geburtstage 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 Hydracarinae. *Revue Suisse Zool.*, 45: 721-806.
- Bandelt H J, Forster P & Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Bañkowska 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 V. N. (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>

- Cichočka 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, Megléc 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: Hydrachnidiae). 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.), Chelicerata, Acari I. 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.
- 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: araneae, 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://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 palaeartic 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 minuoculata* 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, Berljolli 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
- Ivanova NV, Grainger CM (2007a) CCDB protocols, COI amplification. 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
- 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
- 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 Kriebsegel 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. *i sar.* (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 *Hygrobates 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 královské Ceske Spolecnosti Náuk. Trida matematicko-prirodovedecká [Sitzungsberichte der kgl. Böhm Gessellschaft 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 Varšhavskago Obščhestva Estestvoispytatelei*, 23, 95–97.

- Nesemann H (1997) Egel und Kriebegel (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.
- Oceguera-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.
- Oceguera-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>
- Pelaez ML, Valdecasas AG, Martinez 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, Oceguera-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 (Bal- 98 PEŠIĆ I SAR. · 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. Monographs I, Department of Biology, University of Montenegro & Centre for Biodiversity of Montenegro*, pp. 65–86.
- Pešić V (2004b) New records of Halacarid mites (Acari, Halacaroidae) from Crna Gora. In: Pešić, V. (Ed.), *The Biodiversity of the Biogradska Gora National Park. Monographs 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, Cimpean 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 *Hygrobates 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 L, Dabert M, Gerecke R, Martin P, Smit H (2019a) Re-established after hundred years: Definition of *Hygrobates prosiliens* 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 i sar. (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, Vukašinić-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 *Hygrobates 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 *Hygrobates 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](https://doi.org/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 Hydracarinen, 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: Hydrachnidia): 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 (Hydrachnidia, Acari). *Acta Biologica*, 23: 117–126. DOI: <https://doi.org/10.18276/ab.2016.23-10>
- Swofford 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 Böhmisches 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.
- Whiley 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: Hydrachnidia) 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-Łukaszewska A, Czernicki T, Stepień 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

PRILOG 1: Lista svih opisanih vrsta vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u fauni Crne Gore. Vrste pronađene u Skadarskom jezeru i okolnim vodenim tijelima, prema Zawal & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (*).

Broj	Vrsta	Thon (1903)	Muzelijus (1912)	Viets (1936)	Ostali autori
Porodica Lebertidae Thor, 1900					
1	<i>Lebertia bracteata</i> K. Viets, 1925				Gerecke (2009)
2	<i>Lebertia bulgarensis</i> K. Viets, 1926				Gerecke (2009)
3	<i>Lebertia crenophila</i> K. Viets, 1920				Pešić (2004a)
4	<i>Lebertia cuneifera</i> Walter, 1922				Gerecke (2009)
5	<i>Lebertia fimbriata</i> Thor, 1899				Pešić i sar. (2018a)
6	<i>Lebertia glabra</i> Thor, 1897				Pešić (2004)
7	<i>Lebertia guttata</i> K. Viets				Pešić i sar. (2019)
8	<i>Lebertia inaequalis</i> (Koch, 1837) *				Bankowska i sar. 2016
9	<i>Lebertia insignis</i> Neuman, 1880				
10	<i>Lebertia longiseta</i> (Bader, 1955) *				Pešić i sar. (2018a)
11	<i>Lebertia maculosa</i> Koenike, 1902				Pešić (1999)
12	<i>Lebertia maglioi</i> Thor, 1907				Gerecke (2009)
13	<i>Lebertia mediterranea</i> Gerecke, 2009 *				Pešić i sar. (2010)
14	<i>Lebertia porosa</i> (Thor, 1900) *			+	Bankowska i sar. 2016
15	<i>Lebertia rivulorum</i> K.Viets, 1933				Pešić i sar. (2018a)

PRILOG 1: Lista svih opisanih vrsta vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u fauni Crne Gore. Vrste pronađene u Skadarskom jezeru i okolnim vodenim tijelima, prema Zawal & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (*).

Broj	Vrsta	Thon (1903)	Muzelijus (1912)	Viets (1936)	Ostali autori
16	<i>Lebertia salebrosa</i> Koenike, 1908				Pešić i sar. (2018a)
17	<i>Lebertia schechteli</i> Thor, 1913				Pešić i sar. (2018a)
18	<i>Lebertia selfvei</i> Walter, 1911				Gerecke (2009)
19	<i>Lebertia separata</i> Lundblad, 1930 *				Gerecke (2009)
20	<i>Lebertia sparsicapillata</i> Thor, 1905				Gerecke (2009)
21	<i>Lebertia stigmatifera</i> Thor, 1900 *				Pešić (1999)
22	<i>Lebertia variolata</i> Gerecke, 2009				Pešić i sar. (2018a)
Porodica Oxidae Viets, 1926					
23	<i>Oxus angustipositus</i> (K. Viets, 1908) *				Pešić (2002c)
24	<i>Oxus longisetus</i> (Berlese, 1885) *				Pešić (2002c)
25	<i>Oxus ovalis</i> (Müller, 1776) *				Pešić i sar. (2010)
26	<i>Oxus strigatus</i> (Müller, 1776) *				Pešić (2002c)
27	<i>Oxus setosus</i> (Koenike, 1898) *				Pešić i sar. (2018a)
Porodica Sperchontidae, Thor, 1900					
28	<i>Sperchon brevirostris</i> Koenike, 1895 *				Pešić (1999)
29	<i>Sperchon clupeiifer</i> (Piersig, 1896) *			+	Pešić i sar. (2010)
30	<i>Sperchon denticulatus</i> *				Pešić (1999)

PRILOG 1: Lista svih opisanih vrsta vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u fauni Crne Gore. Vrste pronađene u Skadarskom jezeru i okolnim vodenim tijelima, prema Zawal & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (*).

Broj	Vrsta	Thon (1903)	Muzelijus (1912)	Viets (1936)	Ostali autori
31	<i>Sperchon hibernicus</i> Halbert, 1944				Pešić (1999)
32	<i>Sperchon hispidus</i> Koenike, 1895 *				Pešić i sar. (2018a)
33	<i>Sperchon mutilus</i> Koenike, 1895				Pešić (2004a)
34	<i>Sperchon squamosus</i> Kramer, 1879				Pešić (1999)
35	<i>Sperchon thienemanni</i> Koenike, 1907				Pešić (2004a)
36	<i>Sperchon vesnae</i> Pešić, 2003				Pešić (2003a, 2004a)
37	<i>Sperchon violaceus</i> Walter, 1944				Pešić (1999, 2004a)
38	<i>Sperchonopsis procera</i> Láska, 1965				Di Sabatino i sar. (2009)
39	<i>Sperchonopsis verrucosa</i> (Protz, 1896) *				Pešić (1999)
Porodica Teutoniidae Koenike, 1910					
40	<i>Teutonia cometes</i> (Koch, 1837) *				Pešić (1999)
Porodica Torrenticolidae Piersig, 1902					
41	<i>Monatractides</i> <i>madritensis</i> (K.Viets, 1930) *				Pešić i sar. (2010)
42	<i>Monatractides stadleri</i> (Walter, 1924) *				Pešić (1999)
43	<i>Pseudotorrenticola</i> <i>rhynchota</i> Walter, 1906				Di Sabatino i sar. (2003)
44	<i>Torrenticola amplexa</i> (Koenike, 1908) *				Pešić (1999)

PRILOG 1: Lista svih opisanih vrsta vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u fauni Crne Gore. Vrste pronađene u Skadarskom jezeru i okolnim vodenim tijelima, prema Zawal & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (*).

Broj	Vrsta	Thon (1903)	Muzelijus (1912)	Viets (1936)	Ostali autori
45	<i>Torrenticola anomala</i> (Koch, 1837)				Pešić (1999)
46	<i>Torrenticola barsica</i> (Szalay, 1933)				Pešić (1999)
47	<i>Torrenticola brevirostris</i> (Halbert, 1911)				Pešić (1999)
48	<i>Torrenticola dudichi</i> (Szalay, 1933)				Di Sabatino (2003)
49	<i>Torrenticola eliptica</i> (Maglio, 1909)				Pešić (1999)
50	<i>Torrenticola laskai</i> (Di Sabatino, 2009)				Pešić (1999)
51	<i>Torrenticola lukai</i> Pešić, Valdecasas & Garcia-Jimenez, 2012				Pešić i sar. (2012)
52	<i>Torrenticola lundbladi</i> (K. Viets, 1930)				Pešić (2004c)
53	<i>Torrenticola meridionalis</i> (Di Sabatino & Cicolani, 1990)				Di Sabatino (2003)
54	<i>Torrenticola similis</i> (K. Viets, 1939)				Di Sabatino (2003)
55	<i>Torrenticola tenuirostris</i> K. Viets, 1936				Di Sabatino (2003)
56	<i>Torrenticola ungeri</i> (Szalay, 1927)				Pešić (1999)
Porodica Limnesiidae Thor, 1900					
57	<i>Limnesia fulgida</i> Koch, 1836 *				Pešić i sar. (2018a)
58	<i>Limnesia koenikei</i> Piersig, 1894				Pešić (1999)

PRILOG 1: Lista svih opisanih vrsta vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u fauni Crne Gore. Vrste pronađene u Skadarskom jezeru i okolnim vodenim tijelima, prema Zawal & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (*).

Broj	Vrsta	Thon (1903)	Muzelijus (1912)	Viets (1936)	Ostali autori
59	<i>Limnesia maculata</i> (Müller, 1776)		+		Pešić (2002c)
60	<i>Limnesia undulata</i> (Müller, 1776) *	+			Pešić (2002c, 2004a, b)
61	<i>Limnesia undulatoides</i> (Davids, 1997) *				Pešić i sar. (2018a)
Porodica Hygrobatidae Koch, 1842					
62	<i>Hygrobates calliger</i> Piersig, 1896 *				Pešić i sar. (2010)
63	<i>Hygrobates fluviatilis</i> (Strøm, 1768) *		+		Pešić i sar. (2017)
64	<i>Hygrobates foreli</i> (Lebert, 1874)				Pešić (2003g)
65	<i>Hygrobates lacrima</i> Pešić 2020				Pešić i sar. (2020b)
66	<i>Hygrobates limnocrenius</i> Pešić 2020 *				Pešić i sar. (2020b)
67	<i>Hygrobates longipalpis</i> (Hermann, 1804) *		+		Pešić i sar. (2018a)
68	<i>Hygrobates longiporus</i> Thor, 1898				Pešić (2002c)
69	<i>Hygrobates marezaensis</i> Pešić & Dabert, 2017				Pešić i sar. (2017)
70	<i>Hygrobates mediterraneus</i> Pešić 2019 *				Pešić i sar. (2020c)
71	<i>Hygrobates nigromaculatus</i> (Lebert, 1879) *				Pešić i sar. (2018a)
72	<i>Hygrobates norvegicus</i> (Thor, 1897)				Pešić (2003g, 2004a)
73	<i>Hygrobates setosus</i> (Besseling, 1942) *				Bañkowska i sar. 2016

PRILOG 1: Lista svih opisanih vrsta vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u fauni Crne Gore. Vrste pronađene u Skadarskom jezeru i okolnim vodenim tijelima, prema Zawal & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (*).

Broj	Vrsta	Thon (1903)	Muzelijus (1912)	Viets (1936)	Ostali autori
74	<i>Atractides anae</i> Pešić 2020				Pešić i sar. (2020a)
75	<i>Atractides fissus</i> (Walter, 1927)				Pešić (2002d, 2004a)
76	<i>Atractides fluviatilis</i> (Szalay, 1929)				Pešić (1999)
77	<i>Atractides fonticulus</i> (K. Viets, 1920) *				Pešić (2003g)
78	<i>Atractides giberipalpis</i> Piersig, 1898 *				Pešić (1999, 2004a)
79	<i>Atractides graecus</i> K. Viets, 1950				Pešić (2002a, 2003g)
80	<i>Atractides inflatipes</i> Lundblad, 1956, *				Pešić (2001b)
81	<i>Atractides inflatus</i> (Walter, 1925) *				Pešić (2003g)
82	<i>Atractides longisetus</i> Pešić, 2002				Pešić (2002d, 2003b)
83	<i>Atractides nodipalpis</i> (Thor, 1899) *				Pešić (1999)
84	<i>Atractides oblongus</i> (Walter, 1944) *				Pešić (2003g)
85	<i>Atractides orghidani</i> Motaş & Tanasachi, 1960				Pešić (2003f)
86	<i>Atractides ovalis</i> Koenike, 1883				Pešić (1999)
87	<i>Atractides pennatus</i> (K. Viets, 1920) *				Pešić (1999)
88	<i>Atractides protendens</i> K.O. Viets, 1955				Pešić i sar. (2010)
89	<i>Atractides pumilus</i> (Szalay, 1946)				Pešić (1999)

PRILOG 1: Lista svih opisanih vrsta vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u fauni Crne Gore. Vrste pronađene u Skadarskom jezeru i okolnim vodenim tijelima, prema Zawal & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (*).

Broj	Vrsta	Thon (1903)	Muzelijus (1912)	Viets (1936)	Ostali autori
90	<i>Atractides pygmaeus</i> (Motaş & Tanasachi, 1948)				Pešić (2003f, 2004b)
91	<i>Atractides remotus</i> Szalay, 1953				Pešić (2002b)
92	<i>Atractides robustus</i> (Sokolow, 1940)				Pešić (1999, 2004a)
93	<i>Atractides spinipes</i> Koch, 1837				Pešić (2003a)
94	<i>Atractides tener</i> Thor, 1899				Pešić (2003g)
Porodica Unionicolidae Oudemans, 1909					
95	<i>Unionicola aculeata</i> (Koenike, 1890) *				Pešić (2002c)
96	<i>Unionicola crassipes</i> (Müller, 1776) *		+	+	Pešić (2002c)
97	<i>Unionicola gracilipalpis</i> (K. Viets, 1908) *				Pešić (2002c)
98	<i>Unionicola minor</i> (Soar, 1900) *				Pešić (2002c)
99	<i>Unionicola parvipora</i> (Lundblad, 1920)				Pešić (2002c)
100	<i>Neumania deltoides</i> (Piersig, 1894) *			+	Pešić (2002c)
101	<i>Neumania imitata</i> Koenike, 1908				Pešić (2003g)
102	<i>Neumania limosa</i> (Koch, 1836) *				Pešić (2002c, 2003f)
103	<i>Neumania papillosa</i> (Soar, 1902)				Pešić (2002c)
104	<i>Neumania uncinata</i> Walter, 1927				Pešić i sar. (2007)

PRILOG 1: Lista svih opisanih vrsta vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u fauni Crne Gore. Vrste pronađene u Skadarskom jezeru i okolnim vodenim tijelima, prema Zawal & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (*).

Broj	Vrsta	Thon (1903)	Muzelijus (1912)	Viets (1936)	Ostali autori
105	<i>Neumania vernalis</i> (Müller, 1776)		+		Pešić (2002c)
Porodica Pionidae Thor, 1900					
106	<i>Forelia cetrata</i> (Koenike, 1895)				Pešić (2002c)
107	<i>Forelia liliacea</i> (Müller, 1776) *				Pešić (2002c)
108	<i>Forelia variegator</i> (Koch, 1837) *				Pešić (2002c, 2004a)
109	<i>Piona alpicola</i> (Neuman, 1880) *				Pešić i sar. (2018a)
110	<i>Piona carnea</i> (Koch, 1836)	+			Pešić (2002c)
111	<i>Piona coccinea</i> (Koch, 1836)				Bañkowska i sar. 2016
112	<i>Piona damkoehleri</i> K.Viets, 1930				Pešić (2002c)
113	<i>Piona disparilis</i> (Koenike, 1895) *				Pešić (2002c)
114	<i>Piona imminuta</i> (Piersig, 1897) *				Pešić (2002c)
115	<i>Piona nodata</i> (Müller, 1776)	+			Pešić (2002c)
116	<i>Piona pusilla</i> (Neuman, 1875) *				Pešić (2002c)
117	<i>Piona rotundoides</i> (Thor, 1897) *				Pešić i sar. (2018a)
118	<i>Piona stjoerdalensis</i> (Thor, 1897) *				Pešić i sar. (2018a)
119	<i>Pionopsis lutescens</i> (Hermann, 1804) *				Pešić i sar. (2018a)
120	<i>Hydrochoreutes krameri</i> (Piersig, 1896)			+	Pešić (2002c)

PRILOG 1: Lista svih opisanih vrsta vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u fauni Crne Gore. Vrste pronađene u Skadarskom jezeru i okolnim vodenim tijelima, prema Zawal & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (*).

Broj	Vrsta	Thon (1903)	Muzelijus (1912)	Viets (1936)	Ostali autori
121	<i>Tiphys ornatus</i> Koch, 1836				Pešić (2002c)
122	<i>Tiphys torris</i> (Müller, 1776)				Pešić (2002c)
Porodica Aturidae Thor, 1900					
123	<i>Arrenurus albator</i> (Müller, 1776) *				Smit & Pešić (2004)
124	<i>Arrenurus bicuspidator</i> Berlese, 1885				Smit & Pešić (2004)
125	<i>Arrenurus claviger</i> (Koenike, 1885)				Pešić (2002c)
126	<i>Arrenurus compactus</i> Piersig, 1894	+			Smit i sar. (2000)
127	<i>Arrenurus cuspidifer</i> Piersig, 1894 *	+			Smit i sar. (2000)
128	<i>Arrenurus cylindratus cylindratus</i> (Piersig, 1894)				Pešić (2002c)
129	<i>Arrenurus globator</i> (Müller, 1776)	+			Smit i sar. (2000)
130	<i>Arrenurus haplurus</i> K. Viets, 1925				Pešić i sar. (2010)
131	<i>Arrenurus latigenitalis</i> Lundblad, 1956				Smit & Pešić (2004)
132	<i>Arrenurus maculator</i> (Müller, 1776)	+			Smit i sar. (2000)
133	<i>Arrenurus neumani</i> Piersig, 1895	+			Smit i sar. (2000)
134	<i>Arrenurus papillator</i> (Müller, 1776)				Zawal & Jaskuła (2008a, b)
135	<i>Arrenurus perforatus</i> George, 1881				Smit & Pešić (2004)

PRILOG 1: Lista svih opisanih vrsta vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u fauni Crne Gore. Vrste pronađene u Skadarskom jezeru i okolnim vodenim tijelima, prema Zawal & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (*).

Broj	Vrsta	Thon (1903)	Muzelijus (1912)	Viets (1936)	Ostali autori
136	<i>Arrenurus refractariolus</i> Biesiadka, 1978				Smit i sar. (2015)
137	<i>Arrenurus sinuator</i> (Müller, 1776)	+			Smit i sar. (2000)
138	<i>Arrenurus stjoerdalensis</i> (Thor, 1899) *				Pešić i sar. (2018a)
139	<i>Arrenurus virens</i> Neuman, 1880	+			Smit i sar. (2000)
140	<i>Brachypoda versicolor</i> (Müller, 1776)	+	+	+	Pešić i sar. (2018a)
141	<i>Parabrachypoda mutila</i> Walter, 1928 *				Pešić i sar. (2018a)
142	<i>Hexaxonopsis romijni</i> (K. Viets, 1923) *				Pešić i sar. (2018a)
143	<i>Hexaxonopsis serrata</i> (Walter, 1928) *				Pešić i sar. (2018a)
144	<i>Mideopsis orbicularis</i> (Müller, 1776) *				Pešić (1999)
145	<i>Mideopsis roztoczensis</i> (Biesiadka and Kowalik, 1979) *				Pešić i sar. (2018a)
146	<i>Kongsbergia clypeata</i> Szalay, 1945 *				Pešić (1999)
147	<i>Kongsbergia dentata</i> <i>dentata</i> Walter, 1947				Pešić (2003a, 2004b)
148	<i>Kongsbergia largaiollii</i> (Maglio, 1909)				Pešić (2003a, 2004b)
149	<i>Albaxona lundbladi</i> Motaş & Tanasachi, 1947				Pešić (2003g)
150	<i>Axonopsis gracilis</i> (Piersig, 1903)				Pešić (2003a, 2004b)

PRILOG 1: Lista svih opisanih vrsta vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u fauni Crne Gore. Vrste pronađene u Skadarskom jezeru i okolnim vodenim tijelima, prema Zawal & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (*).

Broj	Vrsta	Thon (1903)	Muzelijus (1912)	Viets (1936)	Ostali autori
151	<i>Axonopsis inferorum</i> Motaš & Tanasachi, 1947				Pešić & Gerecke (2003)
152	<i>Axonopsis serrata</i> Walter, 1928				Pešić (1999, 2002c)
153	<i>Ljania bipapillata</i> Thor, 1898				Pešić i sar. (2018a)
154	<i>Ljania macilenta</i> Koenike, 1908				Pešić (1999)
155	<i>Woolastookia</i> <i>rotundifrons</i> (K. Viets, 1922) *				Pešić i sar. (2010)
Porodica Athienemanniidae K. Viets, 1922					
156	<i>Stygohydracarus</i> <i>karanovici</i> (Pešić, 2001)				Pešić (2001b, 2004a)
157	<i>Stygohydracarus</i> <i>subterraneus</i> Walter, 1947				Smit & Pešić (2004)
158	<i>Stygohydracarus</i> <i>troglobius</i> K. Viets, 1932				Pešić (1999)
Porodica Eylaidae Leach, 1815					
159	<i>Eylais degenerata</i> Koenike, 1897 *	+			Pešić (2002c)
160	<i>Eylais planipons</i> Walter, 1924 *				Pešić i sar. (2018a)
Porodica Hydrachnidae Leach, 1815					
161	<i>Hydrachna globosa</i> (De Geer, 1778)				Pešić (2002c)
Porodica Hydrodromidae K. Viets, 1936					

PRILOG 1: Lista svih opisanih vrsta vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u fauni Crne Gore. Vrste pronađene u Skadarskom jezeru i okolnim vodenim tijelima, prema Zawal & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (*).

Broj	Vrsta	Thon (1903)	Muzelijus (1912)	Viets (1936)	Ostali autori
162	<i>Hydrodroma despiciens</i> (Müller, 1776)	+	+		Pešić (2002c, 2004a)
163	<i>Hydrodroma pilosa</i> Besseling, 1940				Pešić (2002c, 2003f)
164	<i>Hydrodroma reinhardi</i> Pešić, 2002 *				Pešić (2002e)
165	<i>Hydrodroma torrenticola</i> (Walter, 1908) *				Pešić (1999)
Porodica Hydryphantidae Piersig, 1896					
166	<i>Hydryphantes dispar</i> (Schaub, 1888) *				Pešić i sar. (2010)
167	<i>Hydryphantes planus</i> Thon, 1899 *				Gerecke (1996)
168	<i>Paninus michaeli</i> Koenike, 1896				Pešić (2003a, 2004a)
169	<i>Paninus torrenticolus</i> Piersig, 1898 *				Pešić (2004a)
170	<i>Parathyas barbiger</i> (K. Viets)				Gerecke (1996)
171	<i>Trichothyas jadranae</i> Pešić 2018 *				Pešić i sar. (2018a)
172	<i>Partmunia naprintua</i> Gerecke, 1996				Gerecke (1996)
173	<i>Partmunia puritana</i> Gerecke, 1996				Gerecke (1996)
174	<i>Protzia eximia</i> (Protz, 1896) *				Gerecke (1996)
175	<i>Protzia halberti</i> (Walter, 1920) *				Pešić (2003c)
176	<i>Protzia invalvaris</i> Piersig, 1898				Gerecke (1996)
177	<i>Protzia pachygnatha</i> K. Viets, 1930				Bañkowska i sar. 2016

PRILOG 1: Lista svih opisanih vrsta vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u fauni Crne Gore. Vrste pronađene u Skadarskom jezeru i okolnim vodenim tijelima, prema Zawal & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (*).

Broj	Vrsta	Thon (1903)	Muzelijus (1912)	Viets (1936)	Ostali autori
178	<i>Protzia rotunda</i> Walter, 1908 *				Pešić (2004a)
179	<i>Protzia rugosa</i> Walter, 1918				Pešić (2003a, 2004a)
180	<i>Protzia squamosa paucipora</i> (K. Viets, 1955)				Gerecke (1996)
181	<i>Protzia squamosa squamosa</i> Walter, 1908				Pešić (2004a)
182	<i>Tartarothyas micrommata</i> K. Viets, 1934 *			+	Gerecke (1996)
183	<i>Tartarothyas romanica</i> Husiatinschi, 19371				Pešić (2004c)
184	<i>Wandesia thori</i> Schecthel, 1912				Pešić (2003g, 2004a)
Porodica Rutripalpidae Sokolow, 1934					
185	<i>Rutripalpis limicola</i> Sokolow, 1934				Gerecke & Tuzovskij (2001)
Porodica Acherontacaridae Cook, 1967					
186	<i>Acherontacarus fonticulus</i> K. Viets, 1934			+	Gerecke & Benfatti (2005)
Porodica Limnocharidae Grube, 1859					
187	<i>Limnochares aquatica</i> (Linnaeus, 1758)*				Pešić (1999)
Porodica Hydrovolziidae Thor, 1905					
188	<i>Hydrovolzia placophora</i> (Monti, 1905)				Pešić (2003g)

PRILOG 1: Lista svih opisanih vrsta vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u fauni Crne Gore. Vrste pronađene u Skadarskom jezeru i okolnim vodenim tijelima, prema Zawal & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (*).

Broj	Vrsta	Thon (1903)	Muzelijus (1912)	Viets (1936)	Ostali autori
Porodica Pontarachnidae Koenike, 1910					
189	<i>Litarachna communis</i> Walter, 1925				Pešić i sar. (2010)
Porodica Feltridae K. Viets, 1926					
190	<i>Feltria armata</i> Koenike, 1902				Pešić i sar. (2010)
191	<i>Feltria cornuta paucipora</i> Szalay, 1946				Pešić (1999, 2004a)
192	<i>Feltria rouxi</i> Walter, 1907 *				Pešić i sar. (2010)
193	<i>Feltria rubra</i> Piercig, 1898				Pešić (1999)
194	<i>Feltria zschokkei</i> Koenike, 1896				Pešić (1999, 2004a)
Porodica Frontipodopsidae (K. Viets, 1931)					
195	<i>Frontipodopsis reticulatifrons</i> Szalay, 1945				Pešić (1999, 2004b)
Porodica Lethaxonidae Cook, Smith & Harvey, 2000					
196	<i>Lethaxona pygmaea</i> K. Viets, 1932 *			+	Pešić i sar. (2010)
Porodica Momoniidae K. Viets, 1926					
197	<i>Stygomomonium latipes</i> <i>latipes</i> Szalay, 1932				Pešić (1999, 2004b)
Porodica Nudomideopsidae Smith, 1990					
198	<i>Nudomideopsis latipalpis</i> (E. Angelier, 1963)				Pešić (2001a)

PRILOG 1: Lista svih opisanih vrsta vodenih grinja (Acari, Hydrachnidia) u fauni Crne Gore. Vrste pronađene u Skadarskom jezeru i okolnim vodenim tijelima, prema Zawal & Pešić (2018), označene su zvjezdicom (*).

Broj	Vrsta	Thon (1903)	Muzelijus (1912)	Viets (1936)	Ostali autori
Porodica Neoacaridae Motaş & Tanasachi, 1947					
199	<i>Neoacarus hibernicus</i> Halbert, 1944				Pešić (1999)
Porodica Athienemanniidae K. Viets, 1922					
200	<i>Mundamella germanica</i> K. Viets, 1913				Pešić (2003g)

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najstrodnijim barkodom u BOLD bazi.

Operativna taksonomska jedinica ID	ID jedinke	BOLD ID	BIN	Lokalitet	Taksonomska oznaka i procenat genetske sličnosti s najstrodnijom sekvencom u BOLD bazi	Koordinate
Limnocharidae						
<i>Limnochares aquatica</i>	31. CG2020_6_C10	DNAEC032-20	BOLD:ACS0438	Podgorica, Rijeka Zeta, Pričelje	<i>Limnochares aquatica</i> 100.00	42.5022N, 19.2225E
Hydryphantidae						
<i>Paninus michaeli</i>	CCDB 38361 A04	DCDDJ004-21	BOLD:ADT7504	Kolašin, Lalevića Dolovi, izvor #1	<i>Paninus michaeli</i> 99.84	42.899N, 19.631E
	CCDB 38361 A05	DCDDJ005-21		Kolašin, Lalevića Dolovi, izvor #1	<i>Paninus michaeli</i> 99.84	42.899N, 19.631E
	CCDB 38361 A06	DCDDJ006-21		Kolašin, Lalevića Dolovi, izvor #1	<i>Paninus michaeli</i> 99.83	42.899N, 19.631E
<i>Trichothyas jadrankae</i>	CCDB-38679-A08	DNCBD008-20	BOLD:AEF1286	Bar, Poseljanski izvor, Poseljani	<i>Hydryphantes sp.</i> 85.56	42.3095N, 19.0518E
<i>Partnunia naprintua</i>	CCDB 38361 A08	DCDDJ008-21	BOLD:AEL6734	Andrijevića, izvor Trešnjevnik	<i>Partnunia cf. steinmanni</i> A LB-2019 90.05	42.7392N, 19.6933E
<i>Protzia invalvaris</i>	CCDB 38361 C11	DCDDJ035-21	BOLD:AEI2833	Kolašin, potok Bistrica	<i>Protzia invalvaris</i> 99.19	42.8054N, 19.4456E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsvrodnijim barkodom u BOLD bazi.

	CCDB38233 A08	DCCDB008-21		Kolašin, Kolašinska rijeka	<i>Protzia invalvaris</i> 99.69	42.8391N, 19.5749E
	CCDB38233 A09	DCCDB009-21		Kolašin, Kolašinska rijeka	<i>Protzia invalvaris</i> 99.39	42.8391N, 19.5749E
	CCDB38233 A10	DCCDB010-21		Kolašin, Kolašinska rijeka	<i>Protzia invalvaris</i> 99.69	42.8391N, 19.5749E
<i>Protzia squamosa paucipora</i>	CCDB 38361 A09	DCDDJ009-21	BOLD:AEL1015	Kolašin, izvor na putu za Trešnjevnik	<i>Protzia squamosa</i> 100.00	42.7405N, 19.6801E
	CCDB 38361 A10	DCDDJ010-21		Kolašin, izvor na putu za Trešnjevnik	<i>Protzia squamosa</i> 100.00	42.7405N, 19.6801E
	CCDB 38361 A11	DCDDJ011-21		Kolašin, izvor na putu za Trešnjevnik	<i>Protzia squamosa</i> 100.00	42.7405N, 19.6801E
<i>Protzia octopora</i>	CCDB38233 D09	DCCDB045-21	BOLD:AEI5747	Mojkovac, rijeka Bistrica	<i>Hydryphantes sp.</i> 83.77	42.9871N, 19.4338E
<i>Protzia halberti</i>	Hyd_MN_VP7	DNAEC081-20	BOLD:AED9646	Bijelo Polje, Lještanica potok	<i>Protzia halberti</i> 98.23	43.0631N, 19.5808E
	3. CG2020_8_2	DNAEC002-20		Bijelo Polje, Lještanica potok	<i>Protzia halberti</i> 100.00	43.0631N, 19.5808E
	4. CG2020_1	DNAEC003-20		Bijelo Polje, Lještanica potok	<i>Protzia halberti</i>	43.0631N, 19.5808E
	5. CG2020_1_3	DNAEC004-20		Bijelo Polje, Lještanica potok	<i>Protzia halberti</i> 100.00	43.0631N, 19.5808E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsvrodnijim barkodom u BOLD bazi.

<i>Protzia rotunda</i>	6. M18_01_1_D10	DNAEC045-20	BOLD:AED8976	Žabljak, Sedlo, izvor Studenac	<i>Protzia rotunda</i> 100.00	43.0973N, 19.0702E
	CCDB-3867-E04	DNCBD052-20		Bar, Međurječka rijeka potok	<i>Protzia rotunda</i> 100.00	42.0363N, 19.2179E
	CCDB-3867-E05	DNCBD053-20		Bar, Međurječka rijeka potok	<i>Protzia rotunda</i> 98.31	42.0363N, 19.2179E
<i>Protzia rugosa</i>	6. CG2020_1_4	DNAEC005-20	BOLD:AEE0170	Bijelo Polje, Lještanica potok	<i>Protzia rugosa</i> 100.00	43.0631N, 19.5808E
	7. CG2020_8 B6	DNAEC017-20		Berane, izvor kod man. Đurđevi stupovi	<i>Protzia rugosa</i> 99.84	42.8527N, 19.862E
	CCDB38233 D05	DCCDB041-21		Mojkovac, rijeka Bistrica	<i>Protzia rugosa</i> 100.00	42.9871N, 19.4338E
Hydrodromidae						
<i>Hydrodroma reinhardi</i>	CCDB-3867-G04	DNCBD076-20	BOLD:AEF0798	Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša	<i>Hydrodroma persica</i> 87.76	42.4057N, 19.3569E
<i>Hydrodroma torrenticola</i>	CCDB-3867-E06	DNCBD054-20	BOLD:AEF3799	Bar, Međurječka rijeka potok	<i>Hydrodroma torrenticola</i> 96.12	42.0363N, 19.2179E
Lebertiidae						
<i>Lebertia maglioi</i>	CCDB 38361 C09	DCDDJ033-21	BOLD:ADK0383	Kolašin, potok Bistrica, Crkvine	<i>Lebertia jadrensis</i> 100.00	42.8054N, 19.4456E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najstrodnijim barkodom u BOLD bazi.

	CCDB-3867-G08	DNCBD080-20		Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša	<i>Lebertia jadrensis</i> 100.00	42.4057N, 19.3569E
	CCDB 38361 C08	DCDDJ032-21		Kolašin, potok Bistrica, Crkvine	<i>Lebertia jadrensis</i> 100.00	42.8054N, 19.4456E
	CCDB-3867-F10	DNCBD070-20		Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	<i>Lebertia jadrensis</i> 100.00	42.5542N, 19.1059E
<i>Lebertia cuneifera</i>	CCDB 38363 A01	SEPTA001-21	BOLD:ADV4392	Nikšić, izvor “Babino sicelo”	<i>Lebertia cuneifera</i> 98.86	42.8043N, 19.2152E
<i>Lebertia variolata</i>	CCDB-3867-B05	DNCBD017-20	BOLD:ADK0996	Bar, potok u selu Godinje	<i>Lebertia variolata</i> 100.00	42.2206N, 19.1118E
	CCDB-3867-B07	DNCBD019-20		Bar, potok u selu Godinje	<i>Lebertia variolata</i> 100.00	42.2206N, 19.1118E
	CCDB-3867-D03	DNCBD039-20		Bar, potok Rikavac iznad starog Bara	<i>Lebertia variolata</i> 99.24	42.1001N, 19.1432E
	CCDB-3867-D04	DNCBD040-20		Bar, potok Rikavac iznad starog Bara	<i>Lebertia variolata</i> 100.00	42.1001N, 19.1432E
	CCDB-3867-D05	DNCBD041-20		Bar, potok Rikavac iznad starog Bara	<i>Lebertia variolata</i> 100.00	42.1001N, 19.1432E
	CCDB-3867-D06	DNCBD042-20		Bar, potok Rikavac iznad starog Bara	<i>Lebertia variolata</i> 100.00	42.1001N, 19.1432E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsirodnijim barkodom u BOLD bazi.

	16. M19_24_3_E7	DNAEC054-20		Bar, Međurječka rijeka potok	<i>Lebertia variolata</i> 99.83	42.0226N, 19.22E
	17. M19_24_3_E8	DNAEC055-20		Bar, Međurječka rijeka potok	<i>Lebertia variolata</i> 100.00	42.0226N, 19.22E
<i>Lebertia natans</i>	CCDB38233 F03	DCCDB063-21	BOLD:AEF5684	Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	<i>Lebertia natans</i> 100.00	42.5541N, 19.1057E
	CCDB38233 F04	DCCDB064-21		Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	<i>Lebertia natans</i> 100.00	42.5541N, 19.1057E
	CCDB-3867-F06	DNCBD066-20		Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	<i>Lebertia natans</i> 100.00	42.5542N, 19.1059E
<i>Lebertia glabra</i>	CCDB38233 C04	DCCDB028-21	BOLD:AEI2925	Kolašin, Kolašinska rijeka	<i>Lebertia glabra</i> 100.00	42.8391N, 19.5749E
	CCDB38233 D03	DCCDB039-21		Kolašin, potok Bistrica, Crkvine	<i>Lebertia glabra</i> 99.08	42.9871N, 19.4338E
	CCDB38233 D04	DCCDB040-21		Kolašin, potok Bistrica, Crkvine	<i>Lebertia glabra</i> 99.85	42.9871N, 19.4338E
	CCDB38233 D01	DCCDB037-21	BOLD:ACS0595	Kolašin, potok Bistrica, Crkvine	<i>Lebertia glabra</i> 99.85	42.9871N, 19.4338E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najstrodnijim barkodom u BOLD bazi.

	CCDB38233 D02	DCCDB038-21		Kolašin, potok Bistrica, Crkvine	<i>Lebertia glabra</i> 98.62	42.9871N, 19.4338E
	CCDB38233 C05	DCCDB029-21	BOLD:ACR9598	Kolašin, Kolašinska rijeka	<i>Lebertia glabra</i> 99.24	42.8391N, 19.5749E
<i>Lebertia inaequalis</i>	CCDB-3867-C03	DNCBD027-20	BOLD:AEF5913	Tuzi, Vitoja, bazen	<i>Lebertia inaequalis</i> 100.00	42.324N, 19.3637E
	CCDB-3867-B11	DNCBD023-20	BOLD:ADF6223	Tuzi, Vitoja, bazen	<i>Lebertia inaequalis</i> 100.00	42.324N, 19.3637E
	CCDB-3867-C02	DNCBD026-20		Tuzi, Vitoja, bazen	<i>Lebertia inaequalis</i> 100.00	42.324N, 19.3637E
	CCDB 38363 B04	SEPTA016-21		Bar, Skadarsko jezero, Murići	<i>Lebertia inaequalis</i> 100.00	42.1637N, 19.2214E
	CCDB 38363 B06	SEPTA018-21		Bar, Skadarsko jezero, Murići	<i>Lebertia inaequalis</i> 99.85	42.1637N, 19.2214E
	CCDB 38363 B10	SEPTA022-21		Podgorica, Skadarsko jezero, Donja Plavnica	<i>Lebertia inaequalis</i> 100.00	42.2724N, 19.2007E
	CCDB 38363 B11	SEPTA023-21		Podgorica, rijeka Gornja Plavnica	<i>Lebertia inaequalis</i> 100.00	42.2889N, 19.2108E
	CCDB-3867-E12	DNCBD060-20		BOLD:AEF2742	Bar, Meduriječka rijeka, potok	<i>Lebertia inaequalis</i> 100.00
<i>Lebertia insignis</i>	CCDB38233 B12	DCCDB024-21	BOLD:AEB9107	Danilovgrad, rijeka Zeta, Slap	<i>Lebertia insignis</i> 100.00	42.6001N, 19.0656E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsvrodnijim barkodom u BOLD bazi.

<i>Lebertia maculosa</i>	32. CG2020_1_C11	DNAEC033-20	BOLD:AED9197	Bijelo Polje, Lještanica, potok	<i>Lebertia maculosa</i> 100.00	43.0631N, 19.5809E
	33. CG2020_1_C12	DNAEC034-2		Bijelo Polje, Lještanica, potok	<i>Lebertia maculosa</i> 99.84	43.0631N, 19.5809E
	1. CG2020_8	DNAEC001-20	BOLD:AED9718	Berane, izvor kod man. Đurđevi stupovi	<i>Lebertia maculosa</i> 98.4	42.8527N, 19.862E
	CCDB 38361 H01	DCDDJ085-21		Kolašin, izvor kod man. Morača	<i>Lebertia maculosa</i> 99.03	42.7668N, 19.3906E
<i>Lebertia porosa</i>	CCDB-3867-G09	DNCBD081-20	BOLD:ACS0974	Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša	<i>Lebertia porosa</i> 99.67	42.4057N, 19.3569E
	CCDB 38363 C10	SEPTA034-21		Cetinje, Rijeka Crnojevića	<i>Lebertia porosa</i> 99.84	42.3557N, 19.0228E
	CCDB38233 A01	DCCDB001-21	BOLD:AED4662	Podgorica, izvor Mareza	<i>Lebertia porosa</i> 99.36	42.4801N, 19.1822E
	7. CG2020_10	DNAEC006-20		Tuzi, Vitoja izvor	<i>Lebertia porosa</i> 100.00	42.3254N, 19.3628E
<i>Lebertia reticulata</i>	Hyd_MN_VP13	DNAEC086-20	BOLD:ADT9218	Šavnik, izvor potoka Bukovica	<i>Lebertia reticulata</i> 99.54	43.0589N, 19.1103E
	Hyd_MN_VP14	DNAEC087-20		Šavnik, izvor potoka Bukovica	<i>Lebertia reticulata</i> 100.00	43.0589N, 19.1103E
	CCDB 38363 A11	SEPTA011-21		Nikšić, izvor Vukovo Vrelo	<i>Lebertia reticulata</i> 99.54	42.8574N, 18.9426E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsvrodnijim barkodom u BOLD bazi.

<i>Lebertia schechteli</i>	9. CG2020	DNAEC008-20	BOLD:AED9612	Žabljak, Sedlo, izvor Studenac	<i>Lebertia schechteli</i> 100.00	43.0973N, 19.0702E
	10. CG2020_2_3	DNAEC009-20		Žabljak, Sedlo, izvor Studenac	<i>Lebertia schechteli</i> 100.00	43.0973N, 19.0702E
Oxidae						
<i>Oxus angustipositus</i>	CCDB 38361 C03	DCDDJ027-21	BOLD:AEB9099	Ulcinj, Šasko jezero	<i>Oxus angustipositus</i> 99.27	41.9768N, 19.3388E
	CCDB-38679-A11	DNCBD011-20		Cetinje, Poseljanski potok, donji dio	<i>Oxus angustipositus</i> 99.45	42.3057N, 19.0557E
	CCDB 38363 B05	SEPTA017-21		Bar, Skadarsko jezero, Murići	<i>Oxus angustipositus</i> 99.85	42.1637N, 19.2214E
	CCDB 38363 B07	SEPTA019-21		Bar, Skadarsko jezero, Murići	<i>Oxus angustipositus</i> 99.85	42.1637N, 19.2214E
Teutoniidae						
<i>Teutonia cometes</i>	33. M19_20_3_F11	DNAEC068-20	BOLD:ACH7884	Podgorica, Mareza kanal	<i>Teutonia cometes</i> 99.84	42.479N, 19.1813E
	Hyd_MN_VP5	DNAEC079-20		Danilovgrad, izvor Svinjiška vrela	<i>Teutonia cometes</i> 99.85	42.6384N, 19.0074E
Sperchontidae						
<i>Sperchon brevirostris</i>	CCDB38233 D07	DCCDB043-21	BOLD:ACP6107	Kolašin, potok Bistrica, Crkvine	<i>Sperchon brevirostris</i> 99.38	42.9871N, 19.4338E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsirodnijim barkodom u BOLD bazi.

	CCDB38233 D08	DCCDB044-21	BOLD:AED3857	Kolašin, potok Bistrica, Crkvine	<i>Sperchon brevirostris</i> 100.00	42.9871N, 19.4338E
	CCDB38233 A11	DCCDB011-21		Kolašin, Kolašinska rijeka, potok	<i>Sperchon brevirostris</i> 100.00	42.8391N, 19.5749E
<i>Sperchon clupeiifer</i>	CCDB-3867-B04	DNCBD016-20	BOLD:ACS1100	Bar, potok u selu Godinje	<i>Sperchon clupeiifer</i> 99.2	42.2206N, 19.1118E
<i>Sperchon hibernicus</i>	CCDB-3867-D02	DNCBD038-20	BOLD:AEF3824	Bar, potok Rikavac iznad starog Bara	<i>Sperchon hibernicus</i> 93.46	42.1001N, 19.1432E
<i>Sperchon hispidus</i>	12. M19 29A 8_E3	DNAEC050-20	BOLD:AED3202	Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuz	<i>Sperchon hispidus</i> 99.36	42.5113N, 19.1982E
	29. CG2020_7_C8C7	DNAEC030-20		Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuz	<i>Sperchon hispidus</i> 99.36	42.5113N, 19.1982E
<i>Spechon denticulatus</i>	10. CG2020_8 B8	DNAEC019-20	BOLD:AED8428	Berane, izvor kod man. Đurđevi stupovi	<i>Spechon violaceus</i> 88.12	42.8527N, 19.862E
<i>Sperchon papillosus</i>	3. M19_12B_1_D7	DNAEC043-20	BOLD:AED2134	Budva, potok, Lastva Grbaljska	<i>Sperchon papillosus</i> 97.72	42.3103N, 18.8138E
<i>Sperchon thienemanni</i>	Hyd_MN_VP4	DNAEC078-20	BOLD:ADV4077	Šavnik, Kikov izvor blizu Boana	<i>Sperchon thienemanni</i> 100.00	42.9465N, 19.1893E
	Hyd_MN_VP10	DNAEC083-20		Žabljak, Sedlo, izvor Studenac	<i>Sperchon thienemanni</i> 100.00	43.0972N, 19.0702E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsirodnijim barkodom u BOLD bazi.

	CCDB 38361 A03	DCDDJ003-21		Kolašin, Lalevića Dolovi, izvor #1	<i>Sperchon thienemanni</i> 98.69	42.899N, 19.631E
	CCDB 38363 A02	SEPTA002-21		Nikšić, planina Lukavica, izvor Babino Sicelo	<i>Sperchon thienemanni</i> 100.00	42.8043N, 19.2152E
	CCDB 38363 A04	SEPTA004-21		Nikšić, planina Lukavica, izvor Babino Sicelo	<i>Sperchon thienemanni</i> 100.00	42.8043N, 19.2152E
	CCDB 38363 A05	SEPTA005-21		Nikšić, planina Lukavica, izvor Babino Sicelo	<i>Sperchon thienemanni</i> 100.00	42.8043N, 19.2152E
<i>Sperchon violaceus</i>	Hyd_MN_VP8	DNAEC088-20	BOLD:AAN0076	Žabljak, Mlinski potok	<i>Sperchon violaceus</i> 100.00	43.1494N, 19.0898E
	27. M19_16A_3_F5	DNAEC062-		Kolašin, Biogradska rijeka	<i>Sperchon violaceus</i> 99.84	42.8968N, 19.6047E
	56. CG2020_1	DNAEC010-20		Bijelo Polje, Lještanica potok	<i>Sperchon violaceus</i> 100.00	43.0631N, 19.5809E
	57. CG2020_8	DNAEC011-20		Bijelo Polje, Lještanica potok	<i>Sperchon violaceus</i> 100.00	43.0631N, 19.5809E
	58. CG2020	DNAEC012-20		Bijelo Polje, Lještanica potok	<i>Sperchon violaceus</i> 99.82	43.0631N, 19.5809E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsvrodnijim barkodom u BOLD bazi.

	26. M19_16A_3_F4	DNAEC061-20		Kolašin, Biogradska rijeka	<i>Sperchon violaceus</i> 99.84	42.8968N, 19.6047E
	28. M19_16A_3_F6	DNAEC063-20		Kolašin, Biogradska rijeka	<i>Sperchon violaceus</i> 99.84	42.8968N, 19.6047E
	CCDB38233 D06	DCCDB042-21		Mojkovac, rijeka Bistrica	<i>Sperchon violaceus</i> 100.00	42.9871N, 19.4338E
	CCDB38233 H10	DCCDB094-21		Mojkovac, izvor u selu Bistrica	<i>Sperchon violaceus</i> 99.51	42.9862N, 19.4349E
	CCDB38233 H11	DCCDB095-21		Mojkovac, izvor u selu Bistrica	<i>Sperchon violaceus</i> 100.00	42.9862N, 19.4349E
<i>Sperchonopsis verrucosa</i>	CCDB 38361 B11	DCDDJ023-21	BOLD:AEK8297	Cetinje, izvor “Smokov vijenac”	<i>Sperchonopsis verrucosa</i> 95.17	42.254N, 18.9902E
	46. M19_16B_1_G10	DNAEC040-20	BOLD:ACS9705	Kolašin, Biogradska rijeka	<i>Sperchonopsis verrucosa</i> 99.84	42.8968N, 19.6047E
Torrenticolidae						
<i>Monatractides madritensis</i>	CCDB-3867-G11	DNCBD083-20	BOLD:AED3803	Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša	<i>Monatractides madritensis</i> 99.84	42.4057N, 19.3569E
	44. M19_12B_3_G8	DNAEC075-20		Budva, Lastva Grbaljska, izvor	<i>Monatractides madritensis</i> 99.84	42.3103N, 18.8138E
	CCDB-3867-B01	DNCBD013-20	BOLD:AEL3852	Bar, izvor u selu Godinje	<i>Monatractides madritensis</i> 99.85	42.2206N, 19.1118E

PRIOLOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsirodnijim barkodom u BOLD bazi.

<i>Monatarctides stadleri</i>	CCDB38233 C03	DCCDB027-21	BOLD:AED3802	Bar, izvor Rikavac iznad starog Bara	<i>Monatarctides stadleri</i> 99.68	42.1001N, 19.1432E
	45. M19_129_3_G9	DNAEC076-20		Budva, Lastva Grbaljska, potok	<i>Monatarctides stadleri</i> 99.67	42.3103N, 18.8138E
<i>Torrenticola amplexa</i>	CCDB-3867-F08	DNCBD068-20	BOLD:ACR0665	Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	<i>Torrenticola amplexa</i> 100.00	42.5542N, 19.1059E
	CCDB-3867-F09	DNCBD069-20		Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	<i>Torrenticola amplexa</i> 100.00	42.5542N, 19.1059E
	CCDB38233 G04	DCCDB076-21		Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	<i>Torrenticola amplexa</i> 100.00	42.5542N, 19.1059E
<i>Torrenticola breviostris</i>	42. M19_29A_5_G6	DNAEC073-20	BOLD:AED9586	Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž	<i>Torrenticola breviostris</i> 98.73	42.5113N, 19.1982E
	CCDB 38363 C12	SEPTA036-21		Podgorica, rijeka Morača, Podgorica	<i>Torrenticola breviostris</i> 98.7	42.4368N, 19.2559E
<i>Torrenticola dudichi</i>	CCDB38233 D11	DCCDB047-21	BOLD:AED7520	Mojkovac, Bistrica potok	<i>Torrenticola dudichi</i> 99.84	42.9871N, 19.4338E
	43. M19_16A_4_G7	DNAEC074-20		Kolašin, Biogradska rijeka, potok	<i>Torrenticola dudichi</i> 99.84	42.8968N, 19.6047E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsirodnijim barkodom u BOLD bazi.

<i>Torrenticola laskai</i>	CCDB-3867-G06	DNCBD078-20	BOLD:AEF5471	Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša	<i>Torrenticola laskai</i> 99.69	42.4057N, 19.3569E
	CCDB-3867-B10	DNCBD022-20		Kolašin, rijeka Tara, Mateševo	<i>Torrenticola laskai</i> 99.69	42.7898N, 19.5374E
	CCDB-3867-E11	DNCBD059-20	BOLD:AED2306	Bar, Međurječka Rijeka, potok	<i>Torrenticola laskai</i> 99.19	42.0363N, 19.2179E
<i>Torrenticola lukai</i>	CCDB 38361 C12	DCDDJ036-21	BOLD:ACH9685	Kolašin, potok Bistrica, Crkvine	<i>Torrenticola lukai</i> 99.52	42.8054N, 19.4456E
<i>Torrenticola meridionalis</i>	CCDB 38361 D02	DCDDJ038-21	BOLD:AED7519	Kolašin, potok Bistrica, Crkvine	<i>Torrenticola meridionalis</i> 98.82	42.8054N, 19.4456E
	CCDB-3867-G02	DNCBD074-20		Bar, rijeka Orahovštica	<i>Torrenticola meridionalis</i> 99.83	42.2476N, 19.0798E
	CCDB-3867-G01	DNCBD073-20		Bar, rijeka Orahovštica	<i>Torrenticola meridionalis</i> 100.00	42.2476N, 19.0798E
	CCDB-3867-B09	DNCBD021-20		Kolašin, rijeka Drcka, Mateševo	<i>Torrenticola meridionalis</i> 100.00	42.7619N, 19.5549E
	CCDB-3867-E01	DNCBD049-20		Bar, izvor Rikavac iznad starog Bara	<i>Torrenticola meridionalis</i> 99.68	42.1001N, 19.1432E
	CCDB-3867-E03	DNCBD051-20		Bar, izvor Rikavac iznad starog Bara	<i>Torrenticola meridionalis</i> 98.87	42.1001N, 19.1432E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsirodnijim barkodom u BOLD bazi.

	CCDB 38361 D01	DCDDJ037-21	BOLD:AEI3402	Kolašin, potok Bistrica, Crkvine	<i>Torrenticola meridionalis</i> 99.68	42.8054N, 19.4456E
	CCDB 38361 B08	DCDDJ020-21		Kolašin, potok Bistrica, Crkvine	<i>Torrenticola meridionalis</i> 98.87	42.8054N, 19.4456E
	CCDB38233 B10	DCCDB022-21		Kolašin, Kolašinska rijeka, potok	<i>Torrenticola meridionalis</i> 98.87	42.8391N, 19.5749E
	CCDB38233 D12	DCCDB048-21		Mojkovac, potok Bistrica	<i>Torrenticola meridionalis</i> 99.68	42.9871N, 19.4338E
<i>Torrenticola similis</i>	CCDB 38361 B09	DCDDJ021-21	BOLD:AEK9661	Kolašin, potok Bistrica, Crkvine	<i>Torrenticola</i> sp. 90.03	42.8054N, 19.4456E
<i>Torrenticola barsica</i>	CCDB-3867-E09	DNCBD057-20	BOLD:AEF1219	Bar, Međurječka rijeka, potok	<i>Torrenticola barsica</i> 100.00	42.0363N, 19.2179E
	CCDB-3867-F04	DNCBD064-20		Bar, Međurječka rijeka, potok	<i>Torrenticola barsica</i> 100.00	42.0363N, 19.2179E
<i>Torrenticola elliptica</i>	CDB38233 B11	DCCDB023-21	BOLD:AEI9183	Kolašin, Kolašinska rijeka, potok	<i>Torrenticola elliptica</i> 92.35	42.8391N, 19.5749E
<i>Torrenticola ungeri</i>	19. M19_24_6_E10	DNAEC057-20	BOLD:AED2307	Bar, Međurječka rijeka, potok	<i>Torrenticola ungeri</i> 100.00	42.0226N, 19.22E
	20. M19_24_6_E11	DNAEC058-20		Bar, Međurječka rijeka, potok	<i>Torrenticola ungeri</i> 100.00	42.0226N, 19.22E

PRIOLOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsvrodnijim barkodom u BOLD bazi.

	CCDB-3867-D08	DNCBD044-20		Bar, izvor Rikavac iznad starog Bara	<i>Torrenticola ungeri</i> 100.00	42.1001N, 19.1432E
	CCDB-3867-G07	DNCBD079-20		Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša	<i>Torrenticola ungeri</i> 100.00	42.4057N, 19.3569E
<i>Pseudotorrenticola rhynchota</i>	CCDB-3867-B02	DNCBD014-20	BOLD:AEF1632	Bar, potok u selu Godinje	<i>Pseudotorrenticola rhynchota</i> 100.00	42.2206N, 19.1118E
	CCDB-3867-B03	DNCBD015-20		Bar, potok u selu Godinje	<i>Pseudotorrenticola rhynchota</i> 100.00	42.2206N, 19.1118E
Limnesiidae						
<i>Limnesia undulata</i>	CCDB-3867-C05	DNCBD029-20	BOLD:AAX5286	Tuzi, Vitoja, bazen	<i>Limnesia undulata</i> 99.85	42.324N, 19.3637E
	CCDB 38363 C03	SEPTA027-21		Tuzi, Skadarsko jezero, Podhum	<i>Limnesia undulata</i> 99.85	42.3139N, 19.3534E
Hygrobatidae						
<i>Atractides fluviatilis</i>	CCDB-3867-G10	DNCBD082-20	BOLD:AEF1143	Podgorica, Rijeka Cijevna, Dinoša	<i>Atractides fissus</i> 80.63	42.4057N, 19.3569E
<i>Atractides fissus</i>	CCDB38233 B03	DCCDB015-21	BOLD:AEI1811	Kolašin, Kolašinska rijeka, potok	<i>Atractides fissus</i> 97.06	42.8391N, 19.5749E
	CCDB38233 D10	DCCDB046-21		Mojkovac, Bistrica potok	<i>Atractides fissus</i> 97.06	42.9871N, 19.4338E
<i>Atractides anae</i>	1. CG2020_8 B3	DNAEC014-20	BOLD:AED1201	Berane, izvor kod man. Đurđevi stupovi	<i>Atractides pennatus</i> 94.22	42.8527N, 19.862E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsirodnijim barkodom u BOLD bazi.

<i>Atractides inflatipalpis</i>	29. M19_24_4_F7	DNAEC064-20	BOLD:AED3549	Bar, Medurječka rijeka, potok	<i>Atractides hyrcaniensis</i> 92.08	42.0226N, 19.22E
<i>Atractides inflatipes</i>	CCDB-3867-G03	DNCBD075-20	BOLD:AEF1144	Bar, Orahovštica, potok	<i>Atractides latipes</i> 80.14	42.2476N, 19.0798E
<i>Atractides fonticolus</i>	CCDB38233 B09	DCCDB021-21	BOLD:AEI8720	Podgorica, Pričelje, izvor Studenac	<i>Atractides fonticolus</i> 96.32	42.4835N, 19.2429E
	CCDB38233 B08	DCCDB020-21		Podgorica, Pričelje, izvor Studenac	<i>Atractides fonticolus</i> 96.32	42.4835N, 19.2429E
<i>Atractides gibberipalpis</i>	CCDB 38361 C07	DCDDJ031-21	BOLD:AEK7766	Kolašin, potok Bistrica, Crkvine	<i>Atractides gibberipalpis</i> 92.83	42.8054N, 19.4456E
	CCDB38233 B02	DCCDB014-21	BOLD:AEI3946	Kolašin, Kolašinska rijeka, potok	<i>Atractides gibberipalpis</i> 95.37	42.8391N, 19.5749E
<i>Atractides inflatus</i>	14. M19_12_4_E5	DNAEC052-20	BOLD:ACB4677	Budva, Lastva Grbaljska, izvor	<i>Atractides</i> sp. At3 93.99	42.3103N, 18.8138E
<i>Atractides nodipalpis</i>	CCDB-3867-F07	DNCBD067-20	BOLD:ACR0209	Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	<i>Atractides nodipalpis</i> 98.06	42.5542N, 19.1059E
	41. M19_29A_1_G5	DNAEC072-20		Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž	<i>Atractides nodipalpis</i> 94.46	42.5113N, 19.1982E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najstrojnijim barkodom u BOLD bazi.

	CCDB-3867-F05	DNCBD065-20	BOLD:AED3547	Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	<i>Atractides nodipalpis</i> 94.35	42.5542N, 19.1059E
	40. M19_29A_1_G4	DNAEC071-20		Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž	<i>Atractides nodipalpis</i> 94.31	42.5113N, 19.1982E
<i>Atractides pennatus</i>	CCDB-3867-F11	DNCBD071-20	BOLD:ADF7007	Bar, potok Orahovštica	<i>Atractides pennatus</i> 100.00	42.2476N, 19.0798E
	CCDB-38679-A09	DNCBD009-20		Bar, Poseljani, Poseljanski potok	<i>Atractides pennatus</i> 100.00	42.3057N, 19.0557E
	25. CG2020_9_C6	DNAEC028-20		Podgorica, Mareza izvor	<i>Atractides pennatus</i> 100.00	42.4801N, 19.1821E
	23. CG2020_9_C5	DNAEC027-20		Podgorica, Mareza izvor	<i>Atractides pennatus</i> 100.00	42.4801N, 19.1821E
	3. CG2020_2 B4	DNAEC015-20		Žabljak, Sedlo, izvor Studenac	<i>Atractides pennatus</i> 99.32	43.0973N, 19.0702E
	32. M19_23_1_F10	DNAEC067-20		Nikšić, Vidrovan, izvor Vukovo vrelo	<i>Atractides pennatus</i> 100.00	42.8575N, 18.9414E
	31. M19_23_1_F9	DNAEC066-20		Nikšić, Vidrovan, izvor Vukovo vrelo	<i>Atractides pennatus</i> 100.00	42.8575N, 18.9414E
	4. M19_22_1 D8	DNAEC042-20		Nikšić, izvor u selu Miločani	<i>Atractides pennatus</i> 100.00	42.8265N, 18.9018E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), 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”	<i>Atractides pennatus</i> 95.22	42.2346N, 18.907E
	CCDB 38363 B12	SEPTA024-21		Budva, izvor “Smokov vijenac”	<i>Atractides pennatus</i> 95.22	42.2346N, 18.907E
<i>Atractides robustus</i>	CCDB-3867-D12	DNCBD048-20	BOLD:ADZ9348	Bar, izvor Rikavac iznad starog Bara	<i>Atractides robustus</i> 94.5	42.1001N, 19.1432E
	CCDB-3867-D11	DNCBD047-20		Bar, izvor Rikavac iznad starog Bara	<i>Atractides robustus</i> 95.06	42.1001N, 19.1432E
	CCDB-3867-D10	DNCBD046-20		Bar, izvor Rikavac iznad starog Bara	<i>Atractides robustus</i> 99.85	42.1001N, 19.1432E
	CCDB 38361 H02	DCDDJ086-21		Kolašin, izvor kod man. Morača	<i>Atractides robustus</i> 100.00	42.7668N, 19.3906E
	CCDB38233 B01	DCCDB013-21		Kolašin, Kolašinska rijeka potok	<i>Atractides robustus</i> 96.41	42.8391N, 19.5749E
<i>Atractides latipes</i>	18. M19_08B_7_E9	DNAEC056-20	BOLD:AED4000	Podgorica, rijeka Cijevna, Trgaja	<i>Atractides inflatipes</i>	42.3964N, 19.3798E
<i>Atractides stankovici</i>	CCDB38233 C08	DCCDB032-21	BOLD:AED3550	Danilovgrad, rijeka Zeta, Slap	<i>Atractides stankovici</i> 95.68	42.6001N, 19.0656E
	CCDB38233 C07	DCCDB031-21		Danilovgrad, rijeka Zeta, Slap	<i>Atractides stankovici</i> 95.67	42.6001N, 19.0656E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsvrodnijim barkodom u BOLD bazi.

	13. CG2020_4 B10	DNAEC020-20		Podgorica, Mareza kanal	<i>Atractides stankovici</i> 98.61	42.479N, 19.1813E
	14. CG2020_4 B11	DNAEC021-20		Podgorica, Mareza kanal	<i>Atractides stankovici</i> 98.61	42.479N, 19.1813E
<i>Hygrobates calliger</i>	CCDB 38361 C06	DCDDJ030-21	BOLD:AEL5782	Kolašin, potok Bistrica, Crkvine	<i>Hygrobates calliger</i> 98.94	42.8054N, 19.4456E
	CCDB-38679-A04	DNCBD004-20	BOLD:AEF4261	Bar, Poseljanski potok, Poseljani	<i>Hygrobates calliger</i> 99.01	42.3095N, 19.0518E
	CCDB-38679-A03	DNCBD003-20		Bar, Poseljanski potok, Poseljani	<i>Hygrobates calliger</i> 99.4	42.3095N, 19.0518E
<i>Hygrobates foreli</i>	Hyd_MN_VP6	DNAEC080-20	BOLD:AEE3281	Žabljak, Mlinski potok	<i>Hygrobates foreli</i> 100.00	43.1494N, 19.0898E
<i>Hygrobates lacrima</i>	27. CG2020_3_C7	DNAEC029-20	BOLD:AED2490	Kolašin, rijeka Tara, Mateševo	<i>Hygrobates limnocrenicus</i> 88.04	42.7897N, 19.5383E
<i>Hygrobates limnocrenicus</i>	13. M19_20_5_E4	DNAEC051-20	BOLD:AED2489	Podgorica, Mareza kanal	<i>Hygrobates</i> sp. 3 MJ-2020 99.68/ <i>Hygrobates limnocrenicus</i> 97.76	42.479N, 19.1813E
<i>Hygrobates longipalpis</i>	CCDB-3867-C07	DNCBD031-20	BOLD:ACR9783	Tuzi, Vitoja, bazen	<i>Hygrobates longipalpis</i> 100.00	42.324N, 19.3637E
	CCDB-3867-C09	DNCBD033-20		Tuzi, Vitoja, bazen	<i>Hygrobates longipalpis</i> 99.68	42.324N, 19.3637E
	CCDB-38679-A10	DNCBD010-20		Bar, Poseljani, Poseljanski potok	<i>Hygrobates longipalpis</i> 100.00	42.3057N, 19.0557E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsvrodnijim barkodom u BOLD bazi.

	CCDB 38363 C04	SEPTA028-21		Tuzi, Skadarsko jezero, Podhum	<i>Hygrobates longipalpis</i>	42.3139N, 19.3534E
<i>Hygrobates mediterraneus</i>	7. M19_24_2_D11	DNAEC046-20	BOLD:AED2190	Bar, Medjurječka rijeka potok	<i>Hygrobates mediterraneus</i> 98.89	42.0226N, 19.22E
	8. M19_24_2_D12	DNAEC047-20		Bar, Medjurječka rijeka potok	<i>Hygrobates mediterraneus</i> 99.83	42.0226N, 19.22E
	36. M19_24_1_G1	DNAEC070-20		Bar, Medjurječka rijeka potok	<i>Hygrobates mediterraneus</i> 100.00	42.0226N, 19.22E
	CCDB-3867-F01	DNCBD061-20		Bar, Medjurječka rijeka potok	<i>Hygrobates mediterraneus</i> 100.00	42.0363N, 19.2179E
<i>Hygrobates norvegicus</i>	Hyd_MN_VP3	DNAEC077-20	BOLD:ACH7323	Šavnik, Kikov izvor, Boan	<i>Hygrobates norvegicus</i> 100.00	42.9465N, 19.1893E
	CCDB 38361 A01	DCDDJ001-21		Kolašin, Lalevića Dolovi, izvor #1	<i>Hygrobates norvegicus</i> 100.00	42.899N, 19.631E
	CCDB 38361 A02	DCDDJ002-21		Kolašin, Lalevića Dolovi, izvor #1	<i>Hygrobates norvegicus</i> 100.00	42.899N, 19.631E
	CCDB 38361 A07	DCDDJ007-21		Kolašin, Lalevića Dolovi, izvor #1	<i>Hygrobates norvegicus</i> 100.00	42.899N, 19.631E
Unionicolidae						
<i>Neumania imitata</i>	15. M19_29C_2_E6	DNAEC053-20	BOLD:AED4073	Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž	<i>Neumania imitata</i> 89.54	42.5113N, 19.1982E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsvrodnijim barkodom u BOLD bazi.

<i>Neumania limosa</i>	CCDB-3867-C10	DNCBD034-20	BOLD:AEF5902	Tuzi, Vitoja, bazen	<i>Neumania limosa</i> 100.00	42.324N, 19.3637E
	CCDB-3867-C01	DNCBD025-20		Tuzi, Vitoja, bazen	<i>Neumania limosa</i> 99.39	42.324N, 19.3637E
	CCDB38233 G06	DCCDB078-21		Tuzi, Vitoja, bazen	<i>Neumania limosa</i> 100.00	42.324N, 19.3637E
<i>Unionicola minor</i>	CCDB-3867-G12	DNCBD084-20	BOLD:AEF4865	Ulcinj, Šasko jezero	<i>Unionicola minor</i> 99.69	41.9768N, 19.3389E
	CCDB 38361 C02	DCDDJ026-21		Ulcinj, Šasko jezero	<i>Unionicola minor</i> 99.65	41.9768N, 19.3389E
	CCDB 38361 C05	DCDDJ029-21		Ulcinj, Šasko jezero	<i>Unionicola minor</i> 99.82	41.9768N, 19.3389E
	CCDB 38363 B09	SEPTA021-21		Tuzi, Vitoja, bazen	<i>Unionicola minor</i> 99.82	42.324N, 19.3637E
	CCDB 38361 C04	DCDDJ028-21	BOLD:AAU0335	Ulcinj, Šasko jezero	<i>Unionicola</i> sp. 99.84	41.9768N, 19.3389E
<i>Unionicola ypsilophora</i>	CCDB 38363 D04	SEPTA040-21	BOLD:AEN6889	Cetinje, Rijeka Crnojevića (<i>Anodonta exulcerata</i>)	<i>Unionicola ypsilophora</i> 95.87	42.3546N, 19.0286E
<i>Piona damkoehleri</i>	CCDB 38361 B03	DCDDJ015-21	BOLD:AEK5107	Danilovgrad, Moromiš bara	<i>Piona damkoehleri</i> 99.84	42.5322N, 19.1993E
	CCDB 38361 B04	DCDDJ016-21		Danilovgrad, Moromiš bara	<i>Piona damkoehleri</i> 99.84	42.5322N, 19.1993E
	CCDB 38361 B05	DCDDJ017-21		Danilovgrad, Moromiš bara	<i>Piona damkoehleri</i> 99.66	42.5322N, 19.1993E
	CCDB 38361 B06	DCDDJ018-21		Danilovgrad, Moromiš bara	<i>Piona damkoehleri</i> 99.66	42.5322N, 19.1993E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsirodnijim barkodom u BOLD bazi.

	CCDB 38361 B07	DCDDJ019-21		Danilovgrad, Moromiš bara	<i>Piona damkoehleri</i> 99.68	42.5322N, 19.1993E
<i>Piona laminata</i>	CCDB 38361 A12	DCDDJ012-21	BOLD:AEL3248	Danilovgrad, Moromiš bara	<i>Piona nodata</i> 87.18	42.5322N, 19.1993E
<i>Piona disparilis</i>	Hyd_MN_VP12	DNAEC085-20	BOLD:AEE3977	Šavnik, izvor Bukovica, bazen	<i>Piona disparilis</i> 98.00	43.0589N, 19.1103E
	CCDB 38363 A08	SEPTA008-21		Nikšić, Vukovo Vrelo izvor, bazen	<i>Piona disparilis</i> 100.00	42.8577N, 18.9416E
	CCDB 38363 A09	SEPTA009-21		Nikšić, Vukovo Vrelo izvor, bazen	<i>Piona disparilis</i> 100.00	42.8577N, 18.9416E
<i>Tiphys torris</i>	CCDB-3867-C08	DNCBD032-20	BOLD:AEF2208	Tuzi, Vitoja, bazen	<i>Typhis torris</i> 97.53	42.324N, 19.3637E
<i>Tiphys ornatus</i>	CCDB 38361 B01	DCDDJ013-21	BOLD:ACS0401	Danilovgrad, Moromiš bara	<i>Typhis ornatus</i> 100.00	42.5322N, 19.1993E
	CCDB 38361 B02	DCDDJ014-21		Danilovgrad, Moromiš bara	<i>Typhis ornatus</i> 100.00	42.5322N, 19.1993E
Wettinidae						
<i>Wettina lacustris</i>	30. M19_20_4_F8	DNAEC065-20	BOLD:ADL2726	Podgorica, Mareza kanal	<i>Wettina podagrica</i> 98.53	42.479N, 19.1813E
Mideopsidae						
<i>Mideopsis milankovici</i>	22. M19_24_2_E12	DNAEC059-20	BOLD:AED2191	Bar, Medjurječka rijeka, potok		42.0226N, 19.22E
<i>Mideopsis roztoczensis</i>	CCDB-38679-A02	DNCBD002-20	BOLD:ACI1492	Cetinje, Poseljanski izvor	<i>Mideopsis roztoczensis</i> 100.00	42.3095N, 19.0518E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsirodnijim barkodom u BOLD bazi.

	CCDB-3867-G05	DNCBD077-20		Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša	<i>Mideopsis roztoczensis</i> 99.85	42.4057N, 19.3569E
	CCDB38233 C12	DCCDB036-21		Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž	<i>Mideopsis roztoczensis</i> 100.00	42.5112N, 19.1991E
	CCDB38233 C11	DCCDB035-21		Danilovgrad, rijeka Zeta, Spuž	<i>Mideopsis roztoczensis</i> 100.00	42.5112N, 19.1991E
	CCDB 38363 D07	SEPTA043-21		Danilovgrad, rijeka Zeta, Vranjske Njive	<i>Mideopsis roztoczensis</i> 99.85	42.4683N, 19.2579E
Athienemanniidae						
<i>Mundamella germanica</i>	1. KIA_20B_D6	DNAEC041-20	BOLD:AED6269	Danilovgrad, Spuž, izvor blizu rijeke Zete		42.5113N, 19.1982E
Aturidae						
<i>Hexaxonopsis serrata</i>	CCDB 38363 B01	SEPTA013-21	BOLD:AEN2897	Bar, Skadarsko jezero, Murići	<i>Hexaxonopsis serrata</i> 99.85	42.1637N, 19.2214E
	CCDB 38363 B02	SEPTA014-21		Bar, Skadarsko jezero, Murići	<i>Hexaxonopsis serrata</i> 99.85	42.1637N, 19.2214E
	CCDB 38363 B03	SEPTA015-21		Bar, Skadarsko jezero, Murići	<i>Hexaxonopsis serrata</i> 99.69	42.1637N, 19.2214E
<i>Parabrachypoda montii</i>	5. M19_20_6_D9	DNAEC044-20	BOLD:AED5455	Podgorica, Mareza kanal	<i>Hydryphantes</i> sp. 80.98	42.479N, 19.1813E

PRILOG 2: Lista barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore. Tabela sadrži identifikacioni broj jedinki (ID), BOLD identifikacioni broj (BOLD ID), Barkod Indeks (BIN), podatke o lokalitetima (sa koordinatama) i rezultat BOLD Engine podudarnosti sa najsrodnijim barkodom u BOLD bazi.

<i>Woolastokia rotundifrons</i>	10. M19_27_2_E1	DNAEC048-20	BOLD:AEE0289	Šavnik, rijeka Tušina, Boan	<i>Woolastookia rotundifrons</i> 99.02	42.9432N, 19.205E
	11. M19_27_2_E2	DNAEC049-20		Šavnik, rijeka Tušina, Boan	<i>Woolastookia rotundifrons</i> 99.35	42.9432N, 19.205E
Arrenuridae						
<i>Arrenurus cylindratus</i>	34. M19_20_1_F12	DNAEC069-20	BOLD:AED6864	Podgorica, Mareza kanal	<i>Arrenurus cylindratus</i> 95.13	42.479N, 19.1813E
<i>Arrenurus refractarioulus</i>	CCDB 38363 A07	SEPTA007-21	BOLD:AEN2842	Nikšić, planina Lukavica, bare	<i>Arrenurus leucarti</i> 96.47 /A. <i>refractarioulus</i> 96.24	42.8118N, 19.1872E

PRILOG 3: Pregled imena haplotipova i GenBank pristupnih brojeva za *COI* sekvence vodenih grinja roda *Atractides* koje su korištene za formiranje mreže haplotipova. Podebljanim slovima označeni su haplotipovi koje nose jedinice iz sliva Skadarskog jezera.

Naziv vrste	Naziv haplotipa	<i>COI</i> pristupni brojevi	Država	Lokalitet	Literatura
<i>Atractides walteri</i>	Hap_1	MK889691	Austrija	NP Gesäuse, Gsenquelle	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides walteri</i>	Hap_2	MK889682	Austrija	NP Gesäuse, Schieselwaldriedel	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides walteri</i>	Hap_3	MK889636; MK889685	Austrija	NP Gesäuse, Pichelmayerschütt	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides walteri</i>	Hap_4	MK889681; MK889683	Austrija	NP Gesäuse, Schieselwaldriedel	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides separatus</i>	Hap_5	MK889637; MK889602	Austrija; Njemačka	Quellfeld westlich Treffnersee; NP Bayrischer Wald, Albrechtschachten	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides macrolaminatus/loricatus</i> grupa	Hap_6	MK889686	Austrija	NP Gesäuse, Asseerland, Klauseckbach	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides brendle</i>	Hap_7	MK889750; MK889742; MK889741	Njemačka	NP Berchtesgaden, Ramsau; NP Berchtesgaden, Klaustal	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides brendle</i>	Hap_8	MK889749	Njemačka	NP Berchtesgaden, Ramsau	Blattner i sar. (2019)

PRILOG 3: Pregled imena haplotipova i GenBank pristupnih brojeva za *COI* sekvence vodenih grinja roda *Atractides* koje su korištene za formiranje mreže haplotipova. Podebljanim slovima označeni su haplotipovi koje nose jedinke iz sliva Skadarskog jezera.

<i>Atractides nodipalpis</i>	Hap_9	MK889743;	Njemačka	NP Schwarzwald, Schönmünzach, Herrenwies	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides nodipalpis</i>	Hap_10	MK889744	Njemačka	NP Schwarzwald, Schönmünzach, Herrenwies	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides vaginalis</i>	Hap_11	MK889603; MK889540	Njemačka; Švajcarska	Benninger Moos, P0; Stillberg, Dischmatal (GB)	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides vaginalis</i>	Hap_12	MK889572	Italija	Val Tresenga, Malga Pozzol, Trentino	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides vaginalis</i>	Hap_13	MK889543; MK889539; MK889531	Švajcarska	Stillberg, Dischmatal (GB); Schwarzenboden, Berner Oberland (BE)	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides vaginalis</i>	Hap_14	MK889532	Švajcarska	Schwarzenboden, Berner Oberland (BE)	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides protendens</i>	Hap_15	MK889645; MK889646	Njemačka	NP Berchtesgaden, Klausbach	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides panniculatus</i>	Hap_16	MK889653; MK889652; MK889651; MK889650	Njemačka	NP Gesäuse, Quelle Mühlbach; NP Berchtesgaden, Klaustal	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides panniculatus</i>	Hap_17	MK889649	Njemačka	NP Berchtesgaden, Klaustal	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides gibberipalpis</i>	Hap_18	MK889727	Njemačka	NP Schwarzwald, Schönmünzach	Blattner i sar. (2019)

PRILOG 3: Pregled imena haplotipova i GenBank pristupnih brojeva za *COI* sekvence vodenih grinja roda *Atractides* koje su korištene za formiranje mreže haplotipova. Podebljanim slovima označeni su haplotipovi koje nose jedinice iz sliva Skadarskog jezera.

<i>Atractides fonticulus</i>	Hap_19	MK889711; MK889710; MK889709	Njemačka	Bredenberg, Bahrenwinkel	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides fissus</i>	Hap_20	MK889707; MK889706	Austrija	Dürrenstein, Moderbach	Blattner i sar. (2019)
<i>Atractides mossaehepii</i>	Hap_21	OM321057; OM321065	Iran	Mazandaran, potok na putu Chalus-Karaj; mali potok na putu Kondelou	Pešić i sar. (2022)
<i>Atractides anae</i>	Hap_22	OL870229	Crna Gora	Berane, izvor kod man. Đurđevi stupovi	Ova disertacija
<i>Atractides fissus</i>	Hap_23	OL870148	Crna Gora	Kolašin, Kolašinska rijeka	Ova disertacija
<i>Atractides fissus</i>	Hap_24	OL870296	Crna Gora	Mojkovac, izvor Bistrica	Ova disertacija
<i>Atractides fluviatilis</i>	Hap_25	OL870211	Crna Gora	Podgorica, rijeka Cijevna, Dinoša	Ova disertacija
<i>Atractides fonticulus</i>	Hap_26	OL870291; OL870079	Crna Gora	Podgorica, Pričelje, izvor Studenac	Ova disertacija
<i>Atractides gibberipalpis</i>	Hap_27	OL870111	Crna Gora	Kolašin, Crkvine, Bistrica	Ova disertacija
<i>Atractides gibberipalpis</i>	Hap_28	OL870115	Crna Gora	Kolašin, Kolašinska rijeka	Ova disertacija

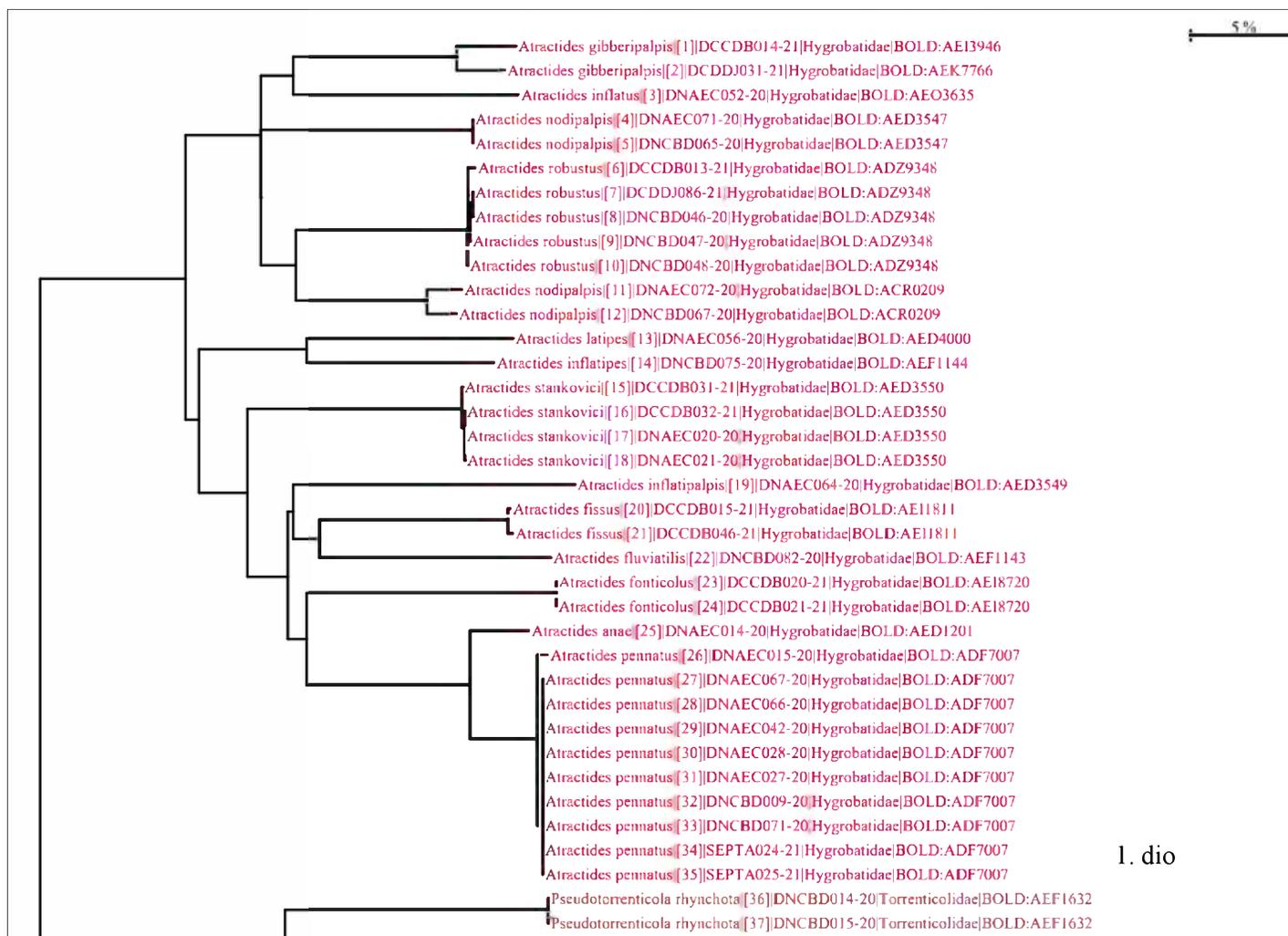
PRILOG 3: Pregled imena haplotipova i GenBank pristupnih brojeva za *COI* sekvence vodenih grinja roda *Atractides* koje su korištene za formiranje mreže haplotipova. Podebljanim slovima označeni su haplotipovi koje nose jedinice iz sliva Skadarskog jezera.

<i>Atractides inflatipalpis</i>	Hap_29	OL870164	Crna Gora	Bar, Međurječka rijeka, potok	Ova disertacija
<i>Atractides inflatipes</i>	Hap_30	OL870205	Crna Gora	Bar, Orahovštica potok	Ova disertacija
<i>Atractides inflatus</i>	Hap_31	OL870097	Crna Gora	Budva, Lastva Grbaljska, izvor	Ova disertacija
<i>Atractides latipes</i>	Hap_32	OL870105	Crna Gora	Podgorica, rijeka Cijevna, Trgaja	Ova disertacija
<i>Atractides nodipalpis</i>	Hap_33	OL870084	Crna Gora	Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta	Ova disertacija
<i>Atractides nodipalpis</i>	Hap_34	OL870182; OL870145	Crna Gora	Danilovgrad, izvor ispod gradskog mosta; Spuž, rijeka Zeta	Ova disertacija
<i>Atractides nodipalpis</i>	Hap_35	OL870210	Crna Gora	Spuž, rijeka Zeta	Ova disertacija
<i>Atractides pennatus</i>	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

PRILOG 3: Pregled imena haplotipova i GenBank pristupnih brojeva za *COI* sekvence vodenih grinja roda *Atractides* koje su korištene za formiranje mreže haplotipova. Podebljanim slovima označeni su haplotipovi koje nose jedinke iz sliva Skadarskog jezera.

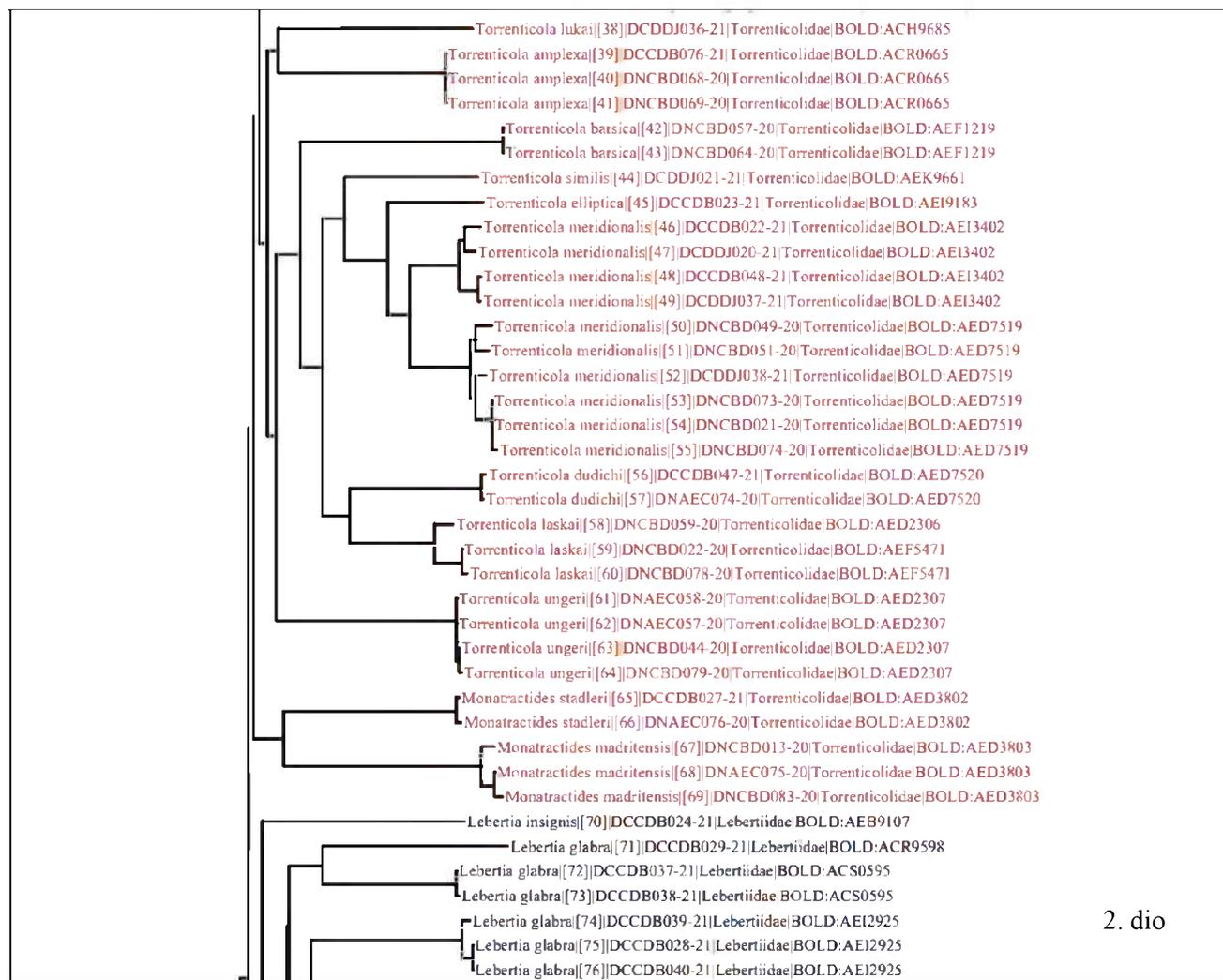
<i>Atractides pennatus</i>	Hap_37	OL870138	Crna Gora	Žabljak, Sedlo, izvor Studenac	Ova disertacija
<i>Atractides robustus</i>	Hap_38	OL870295; OL870178;	Crna Gora	Kolašin, izvor manastir Morača, Kolašinska rijeka;	Ova disertacija
<i>Atractides robustus</i>	Hap_39	OL870094	Crna Gora	Bar, izvor iznad starog Bara	Ova disertacija
<i>Atractides robustus</i>	Hap_40	OL870301	Crna Gora	Bar, izvor iznad starog Bara	Ova disertacija
<i>Atractides robustus</i>	Hap_41	OL870212	Crna Gora	Bar, izvor iznad starog Bara	Ova disertacija
<i>Atractides stankovici</i>	Hap_42	OL870245; OL870231; OL870242	Crna Gora	Danilovgrad, rijeka Zeta	Ova disertacija
<i>Atractides stankovici</i>	Hap_43	OL870189	Crna Gora	Danilovgrad, rijeka Zeta; Podgorica, Mareza kanal	Ova disertacija

PRILOG 4: Filogenetsko stablo barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore, konstruisano metodom susjednog sparivanja (NJ) na osnovu 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.



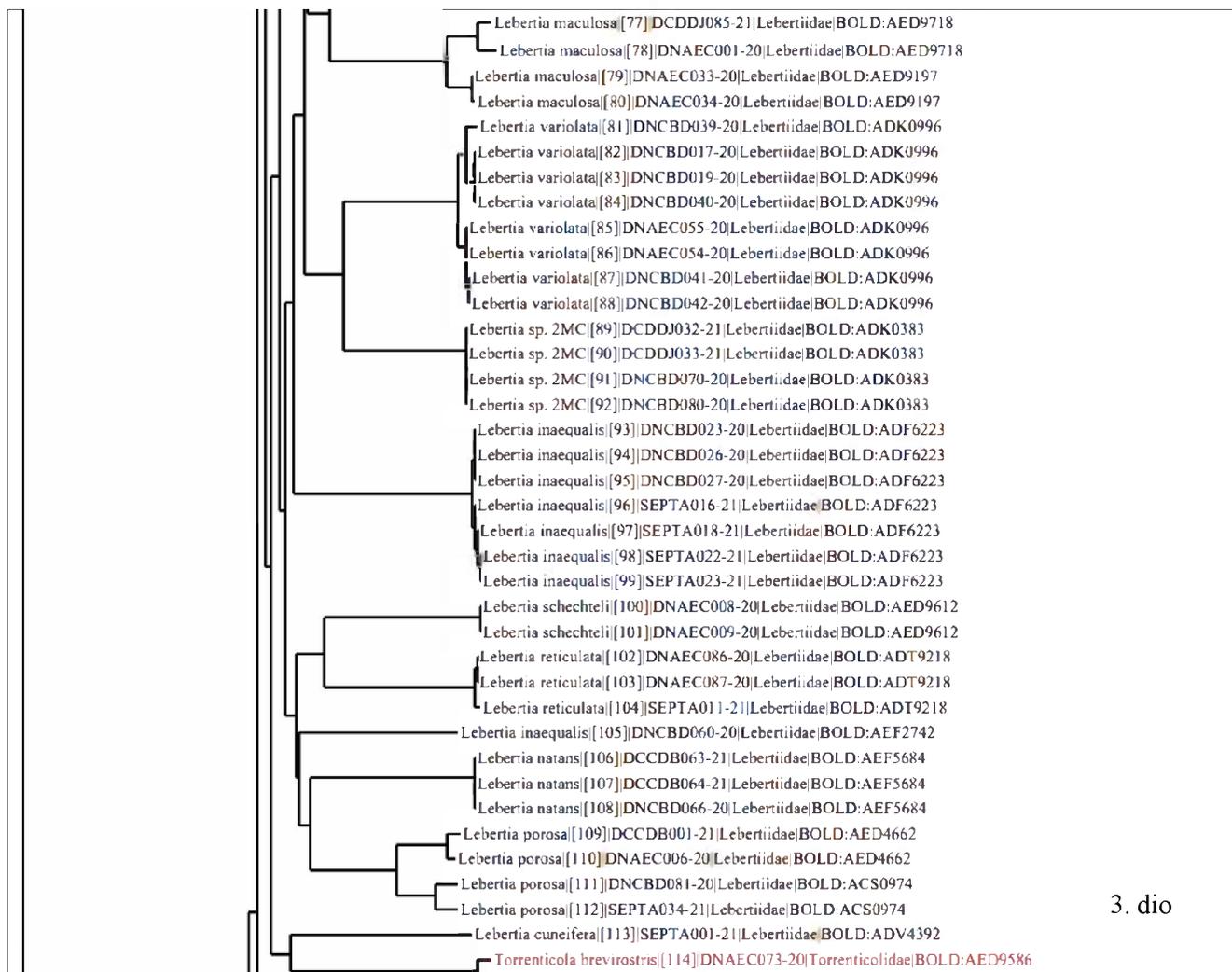
1. dio

PRILOG 4: Filogenetsko stablo barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore, konstruisano metodom susjednog sparivanja (NJ) na osnovu 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.

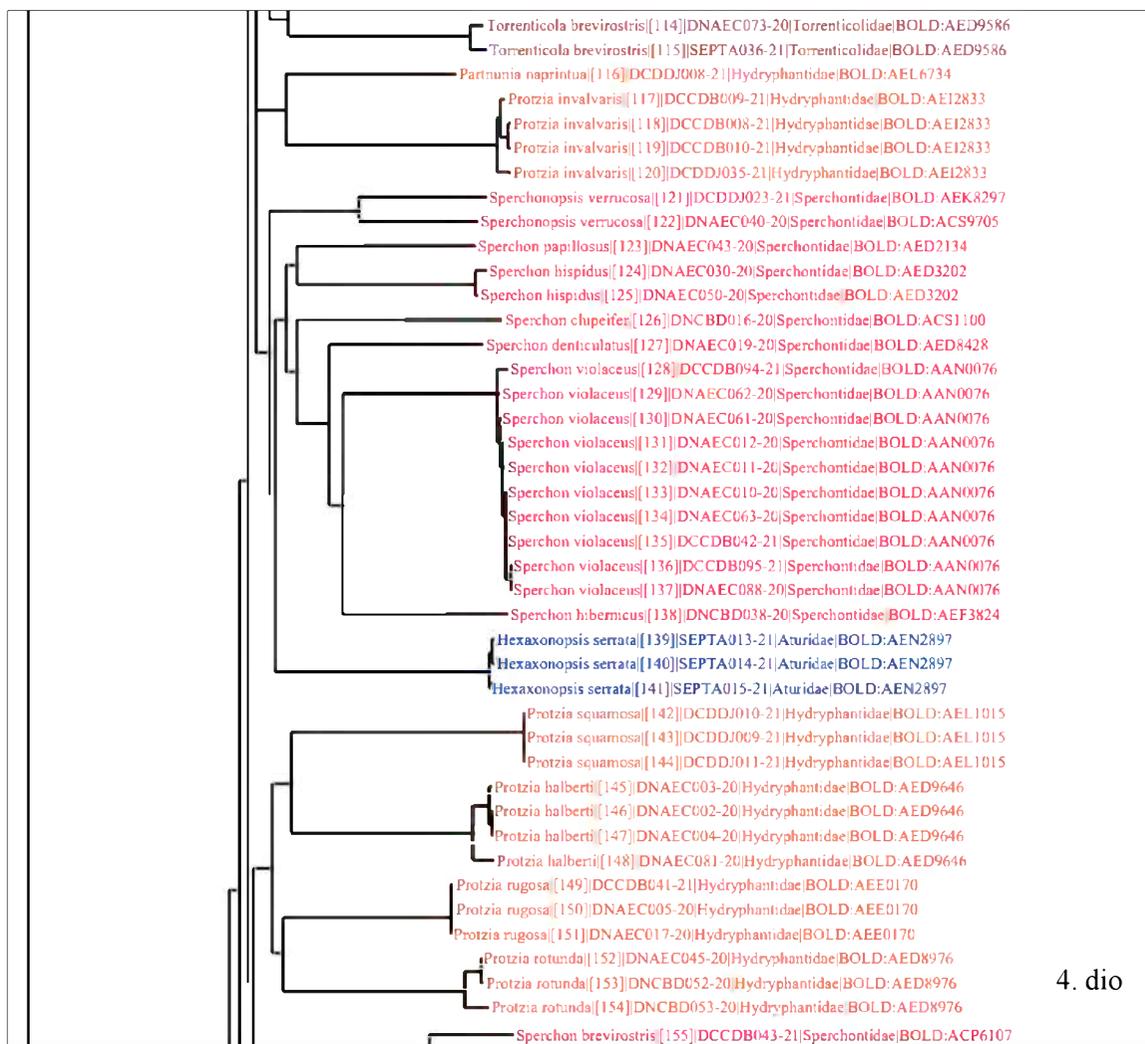


2. dio

PRILOG 4: Filogenetsko stablo barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore, konstruisano metodom susjednog sparivanja (NJ) na osnovu 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.

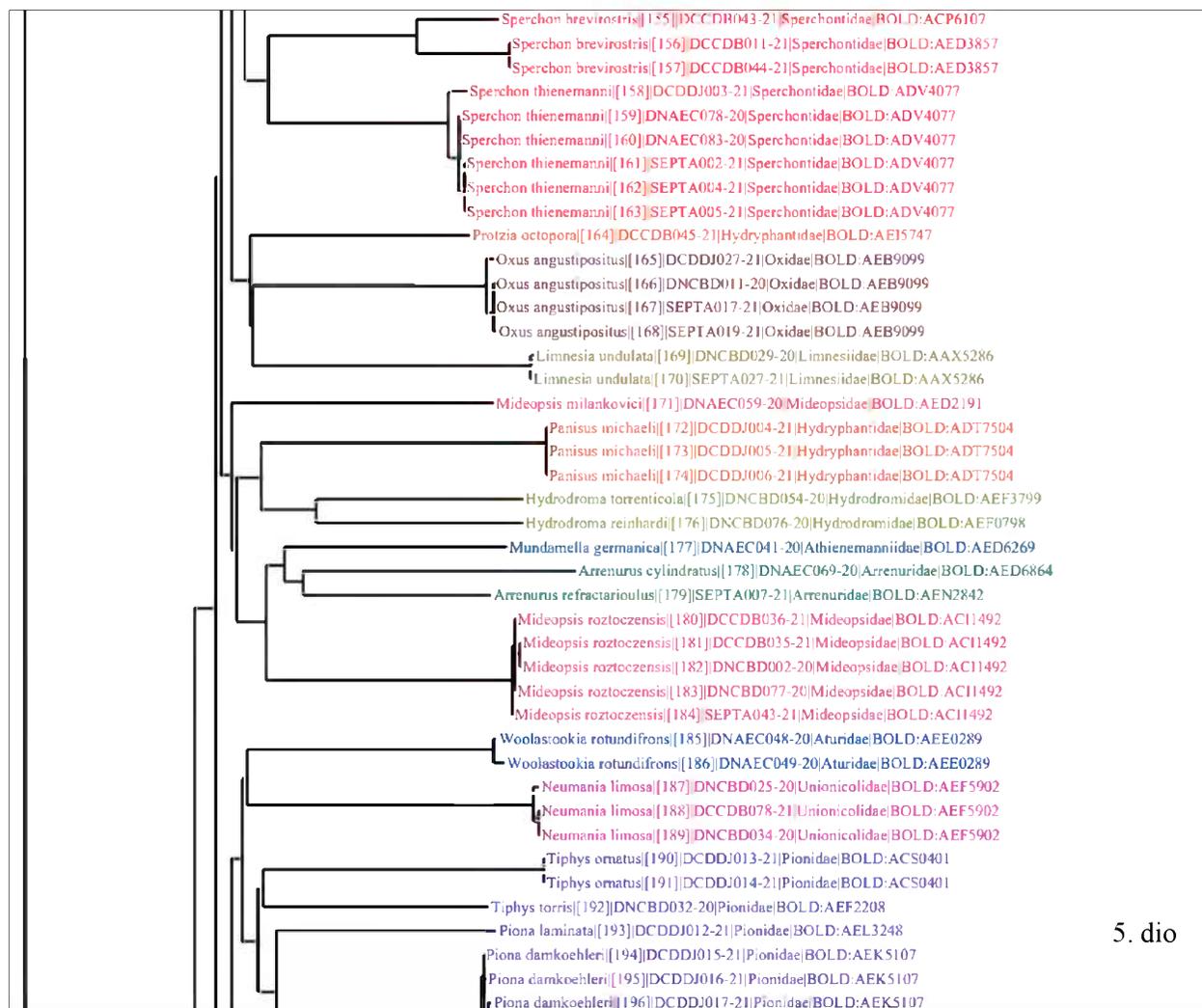


PRILOG 4: Filogenetsko stablo barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore, konstruisano metodom susjednog sparivanja (NJ) na osnovu mitohondrijskog *COI* gena, korišćenjem analitičkog alata “Taxon ID tree” dostupnog u BOLD bazi. Porodice vodenih grinja predstavljene su različitim bojama. Za svaku od 232 jedinke prikazan je: naziv vrste, redni broj i ID iz BOLD baze, naziv porodice i BIN.



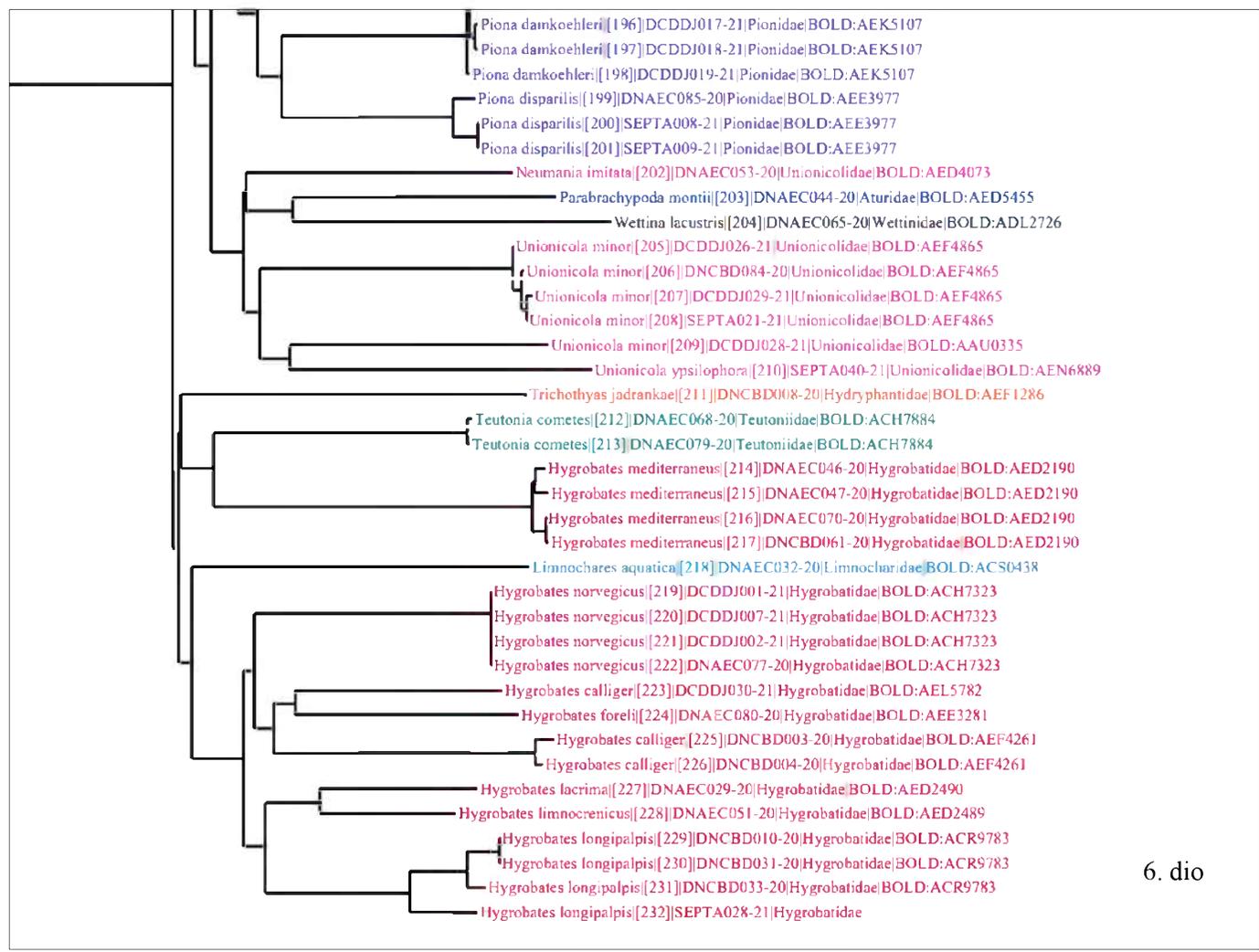
4. dio

PRILOG 4: Filogenetsko stablo barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore, konstruisano metodom susjednog sparivanja (NJ) na osnovu 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

PRILOG 4: Filogenetsko stablo barkodiranih jedinki vodenih grinja Crne Gore, konstruisano metodom susjednog sparivanja (NJ) na osnovu 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.



KRATKA BIOGRAFIJA AUTORA

Milica Jovanović rođena je 30. oktobra 1993. godine u Podgorici. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Danilovgradu. Dobitnica je diplome “Luča” za odličan uspjeh u svim razredima osnovne i srednje škole i nagrade za učenika generacije Gimnazije "Petar I Petrović Njegoš".

Osnovne studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Podgorici, smjer Biologija, završila je 2015. godine, sa prosječnom ocjenom 9,93. Iste godine, kroz program Erasmus Mundus stekla je stipendiju za dvogodišnje magistarske studije na Univerzitetu Primorska u Sloveniji. Magistarsku tezu “Pregled faune puževa golaća (Opisthobranchia, Mollusca) u Bokokotorskom zalivu, Crna Gora”, odbranila je 17. septembra 2018. godine, pod mentorstvom prof. dr Lovrenca Lipeja (Nacionalni institut za Biologiju, Morska biološka stanica Piran, Slovenija) i komentorstvom dr Vesne Mačić (Institut za Biologiju mora, Kotor, Crna Gora).

Doktorske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Podgorici, upisala je u oktobru 2018. godine. Istovremeno je započela i radni angažman na Studijskom programu Biologija. Kao saradnik u nastavi, Milica je angažovana na većem broju predmeta: Zoologija nižih beskičmenjaka, Ekologija životinja, Ekologija životinja sa zoogeografijom, Ekologija biljaka, Organska hemija i Biohemija.

Autor i koautor je 15 radova objavljenih u međunarodnim i domaćim časopisima, kao i na međunarodnim i domaćim konferencijama. Stručno se usavršavala tokom boravaka u Prirodnjačkom muzeju u Beču (Austrija), Univerzitetu Sarland u Sarbrikeni (Njemačka), Univerzitetu Evora (Portugal) i Univerzitetu Lođ (Poljska).

Govori engleski i ruski, a služi se italijanskim i slovenačkim jezikom.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Milica Jovanović

Broj indeksa/upisa 4/18

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„FILOGENIJA, FILOGEOGRAFIJA I DISTRIBUCIJA VRSTA GLOSSIPHONIIDAE
(HIRUDINEA) I HYDRACHNIDIA (ACARI) NA PODRČJU SLIVA
SKADARSKOG JEZERA“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija ni u cjelini ni u djelovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih ustanova visokog obrazovanja,
- da su rezultati korektno navedeni, i
- da nijesam povrijedio/la autorska i druga prava intelektualne svojine koja pripadaju trećim licima.

Potpis doktoranda

U _____

Izjava o istovjetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Milica Jovanović

Broj indeksa/upisa 4/18

Studijski program Biologija

Naslov rada “Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (Hirudinea) i Hydrachnidia (Acari) na području sliva Skadarskog jezera”

Mentor prof. dr Vladimir Pešić

Potpisani/a Milica Jovanović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovjetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore.

Istovremeno izjavljujem da dozvoljavam objavljivanje mojih ličnih podataka u vezi sa dobijanjem akademskog naziva doktora nauka, odnosno zvanja doktora umjetnosti, kao što su ime i prezime, godina i mjesto rođenja, naziv disertacije i datum odbrane rada.

Potpis doktoranda

U _____

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku da u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore pohrani moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

“Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (Hirudinea) i Hydrachnidia (Acari) na području sliva Skadarskog jezera”

koja je moje autorsko djelo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. **Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima**
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U _____

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Milica Jovanović

Broj indeksa/upisa 4/18

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„FILOGENIJA, FILOGEOGRAFIJA I DISTRIBUCIJA VRSTA GLOSSIPHONIIDAE
(HIRUDINEA) I HYDRACHNIDIA (ACARI) NA PODRČJU SLIVA
SKADARSKOG JEZERA“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija ni u cjelini ni u djelovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih ustanova visokog obrazovanja,
- da su rezultati korektno navedeni, i
- da nijesam povrijedio/la autorska i druga prava intelektualne svojine koja pripadaju trećim licima.

U Podgorici, 21.10.2022.

Potpis doktoranda
Jovanović Milica

Izjava o istovjetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Milica Jovanović

Broj indeksa/upisa 4/18

Studijski program Biologija

Naslov rada “Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (Hirudinea) i Hydrachnidia (Acari) na području sliva Skadarskog jezera”

Mentor prof. dr Vladimir Pešić

Potpisani/a Milica Jovanović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovjetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore.

Istovremeno izjavljujem da dozvoljavam objavljivanje mojih ličnih podataka u vezi sa dobijanjem akademskog naziva doktora nauka, odnosno zvanja doktora umjetnosti, kao što su ime i prezime, godina i mjesto rođenja, naziv disertacije i datum odbrane rada.

U Podgorici, 21.10.2022.

Potpis doktoranda

Jovanović Milica

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku da u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore pohrani moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

“Filogenija, filogeografija i distribucija vrsta Glossiphoniidae (Hirudinea) i Hydrachnidia (Acari) na području sliva Skadarskog jezera”

koja je moje autorsko djelo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. **Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima**
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Podgorici, 21.10.2022.

Potpis doktoranda
Jovanović Milica