

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Boris B. Novaković

**MORFOMETRIJSKA I FILOGENETSKA ANALIZA  
VRSTA FAMILIJE ELMIDAE (INSECTA:  
COLEOPTERA) BALKANSKOG POLUOSTRVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Boris B. Novaković

**MORPHOMETRIC AND PHYLOGENETIC  
ANALYSIS OF THE FAMILY ELMIDAE (INSECTA:  
COLEOPTERA) OF THE BALKAN PENINSULA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

**Mentori:**

Dr Ivana Živić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Dr Vlatka Mičetić Stanković, naučni saradnik  
Hrvatski prirodoslovni muzej, Zagreb

**Članovi komisije:**

Dr Katarina Stojanović, docent  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Dr Jelena Tomović, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka  
istraživanja „Siniša Stanković”

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Fedoru Čiamporu (Slovačka akademija nauka i umetnosti, Bratislava) i dr Vanji Markoviću na svesrdnoj pomoći i sugestijama tokom istraživanja.*

*Veliku zahvalnost dugujem mentorima, prof. dr Ivani Živić i dr Vlatki Mičetić Stanković, kao i članovima komisije, doc. dr Katarini Stojanović i dr Jeleni Tomović na sugestijama tokom istraživanja, izdvojenom vremenu i trudu.*

*Najsrdačnije se zahvaljujem dragim kolegama: Predragu Mitroviću (Institut za vode, Bijeljina), dr Teodori Teofilovoj (IBER, Bugarska akademija nauka, Sofija), dr Marku Rakoviću (Prirodnački muzej, Beograd), dr Branki Bruvo Mađarić (Institut „Ruđer Bošković”, Zagreb), Jeleni Duknić, dr Božici Vasiljević, dr Momiru Paunoviću (Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”), dr Đurađu Miloševiću (PMF, Niš), dr Gaboru Mesarošu, Marku Jankoviću (ESA Biodiv, Francuska), prof. dr Cesc Murii (Univerzitet u Barseloni), dr Manfredu Jächu (Prirodnački muzej, Beč), Oskaru Vorstu i dr Arjenu Speksnijderu (Naturalis Biodiversity Centar, Utrecht, Holandija).*

*Takođe zahvalan sam i kolegama iz Agencije za zaštitu životne sredine na podršci tokom istraživanja: Snežani Čađo, Aleksandri Đurković, Dunji Žarić, Zoranu Stojanoviću, Ljubiši Deniću, Milici Nadeždić, Tatjani Dopuđi Glišić, dr Nebojši Veljkoviću, Petru Kostiću, Zlatiboru Bojkoviću, Zdravku Ševu, Svetislavu Deniću, Milunu Džogoviću, Zoranu Kuzmanoviću, Milanu Žikiću†, i iz Republičkog Hidrometeorološkog zavoda: Ljubi Vasiljeviću†, Dušanu Vasiljeviću, Ivici Dimitrovu, Saši Živiću, Radiši Milojkoviću i Predragu Stefanoviću.*

*Veliko hvala i kolegama: Holo Ildiko i Atili Petri (Regionalni inspektorat za životnu sredinu i zaštitu prirode Donje Tise, Segedin), Atili Czirok (Univerzitet u Debrecinu) i Renati Ćuk (Hrvatske vode, Zagreb).*

*Uveren sam da bi Praskovja† i Vladimir Pantelić† bili ponosni: Oni su prirodu voleli i skonski.*

*Najsrdačnije se zahvaljujem svojoj suprudi Andelki, roditeljima Ljiljani i Blaži, bratu Viktoru, bratu Ivanu i ujni Pelki na iskrenoj podršci tokom istraživanja.*

*„Dalekosežnost naučnog istraživanja je nemerljiva; oduvek predvodena istrajnošću, prožeta nepredvidljivošću, u novim iskoracima spoznaje saznanja”.*

*Autor*

## **Morfometrijska i filogenetska analiza vrsta familije Elmidae (Insecta: Coleoptera) Balkanskog poluostrva**

### **Sažetak:**

Akvatični tvrdokrilci familije Elmidae, iako su prepoznati kao važna grupa u bioindikaciji vodenih ekosistema, na području Balkanskog poluostrva su još uvek taksonomski nedovoljno istraženi. Stoga, u svrhu sveobuhvatne analize ove familije, primenjena je intergrativna taksonomija koja objedinjuje morfometrijske, ekološke i molekularne analize taksona.

Tradicionalnom morfometrijskom analizom, koja je obuhvatila 16 izabranih morfometrijskih parametara tri vrste roda *Limnius*: *L. volckmari*, *L. intermedius* i *L. opacus*, i tri vrste roda *Elmis*: *E. cf. aenea*, *E. cf. maugetii* i *E. cf. rioloides*, utvrđeno je da je kod analiziranih vrsta izražena intra- i interspecijska populaciona varijabilnost. Postoji uticaj abiotičkih, pre svega fizičkih i hemijskih parametara vode na morfometriju navedenih vrsta, kao i na sastav i strukturu populacija iz različitih zemalja Balkana (Srbija, Bosna i Hercegovina i Bugarska). Kod vrste *E. maugetii* analiziran je uticaj hidrološkog pritiska na morfometriju vrste i pokazano je da su krupnije jedinke nađene u rekama sa većim proticajem.

Filogenetska analiza elmida Balkana obuhvatila je 8 taksona iz Srbije, Hrvatske, Bugarske, Severne Makedonije i Grčke. Različite populacije istih vrsta pokazuju slabo izraženu intraspecijsku geografsku varijabilnost unutar analiziranih gena mitohondrijalne DNK, što je potkrepljeno rezultatima ovog istraživanja.

Kod vrste *Elmis maugetii* analizirani su i populacioni-genetički parametri i utvrđene razlike populacija sa Balkana u odnosu na populacije 6 zemalja u Evropi i jedne u severnoj Africi. Genetički diverzitet ove vrste je manji na severu, što ukazuje da je mogući postglacijski pleistoicenski koridor rekolonizacije počeo sa područja Balkanskog poluostrva koje predstavlja njen glavni glacijalni refugijum u Evropi.

**Ključne reči:** akvatični tvrdokrilici, familija Elmidae, morfometrija, filogenija, filogeografija, mitohondrijalni geni, Balkansko poluostrvo, refugijum, postglacijska rekolonizacija

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Morfologija, sistematika i filogenija životinja

## **Morphometric and Phylogenetic Analysis of the Family Elmidae (Insecta: Coleoptera) of the Balkan Peninsula**

### **Abstract:**

Aquatic beetles of the family Elmidae, whilst recognized as important bioindicator group, are still taxonomically poorly explored in the Balkan Peninsula. Thus, for the purpose of comprehensive analysis of this family, the integrative taxonomic approach was applied comprising morphometric, ecological and molecular taxa analyses.

Based on traditional morphometric analysis, including 16 selected morphometric parameters of three species of the genus *Limnius*: *L. volckmari*, *L. intermedius* and *L. opacus* as well as of three species of the genus *Elmis*: *E. cf. aenea*, *E. cf. maugetii* and *E. cf. rioloides* it is asserted that intra- and interspecific population variability were expressed. Abiotic factors, predominantly physical and chemical parameters of water affected the species' morphometrics, and population composition and structure from different Balkan's countries (Serbia, Bosnia and Hercegovina and Bulgaria). For *E. maugetii* the influence of hydrological pressure to the species' morphometrics was analysed and it was shown the larger specimens were found in streams characterised by higher flow velocity.

Phylogenetic analysis of the Balkan's riffle beetles included eight taxa from the following countries: Serbia, Croatia, Bulgaria, North Macedonia and Greece. Different populations of same taxa barcoded had low intraspecific geographic variation within analysed mtDNA genes, which was corroborated by the results of the present study.

For *Elmis maugetii* the population-genetic parameters were calculated for the Balkans' populations and compared to six European countries and one North African country as well. Genetic diversity of *E. maugetii* was lower in northern latitudes of Europe revealing the species possible postglacial recolonization corridor most likely started from the Balkan Peninsula, suggested as the species' main glacial refugium in Europe.

**Keywords:** aquatic beetles, the Elmidae family, morphometrics, phylogeny, phylogeography, mitochondrial genes, the Balkan Peninsula, refugium, postglacial recolonization

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Morphology, systematics and phylogeny of animals

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Osnovne odlike akvatičnih tvrdokrilaca kao specijalizovane grupe .....	1
1.2. Diverzitet akvatičnih tvrdokrilaca .....	2
1.3. Uticaj abiotičkih i biotičkih faktora na akvatične tvrdokrilce .....	3
1.4. Disperzija i plovidba.....	5
1.5. Evoluciona biologija akvatičnih tvrdokrilaca.....	7
1.5.1. Istorija tranzicija staništa .....	7
1.5.2. Glacijalni refugijumi i postglacijalna rekolonizacija vrsta.....	9
1.6. Opšte karakteristike familije Elmidae .....	11
1.6.1. Biologija i ekologija familije Elmidae.....	11
1.6.2. Elmide kao bioindikatori .....	16
1.6.3. Konzervacione studije familije Elmidae.....	17
1.6.4. Klasifikacija i diverzitet familije Elmidae.....	17
1.6.5. Taksonomija familije Elmidae.....	20
1.6.6. Taksonomske karakteristike roda <i>Limnius</i> Illiger, 1802 .....	21
1.6.7. Taksonomske karakteristike roda <i>Elmis</i> Latreille, 1798 .....	22
1.7. Istraženost familije Elmidae .....	22
1.8. Upotreba mitohondrijalnih gena u filogenetskim analizama tvrdokrilaca .....	24
<b>2. CILJEVI.....</b>	<b>26</b>
<b>3. METODOLOGIJA RADA I MATERIJAL.....</b>	<b>28</b>
3.1. Metode uzorkovanja .....	28
3.2. Laboratorijska obrada materijala .....	31
3.3. Morfometrijska analiza.....	31
3.3.1. Morfometrijski karakteri i morfometrijski indeksi .....	32
3.3.2. Određivanje inter- i intraspecijske varijabilnosti.....	35
3.3.2.1. Analiza glavnih komponenti (PCA) i diskriminantna analiza (DA) .....	35
3.3.2.2. SOM ( <i>Self-Organizing Map</i> ) analiza.....	36
3.3.3. Morfometrijska varijabilnost karaktera u odnosu na hidrološke .....	37
parametre .....	37
3.4. Uticaj abiotičkih faktora na populacije elmida.....	40

3.5. Molekularne i filogenetske analize.....	41
3.5.1. Populaciono-genetičke analize vrste <i>Elmis maugetii</i> Latreille, 1802 .....	45
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>48</b>
4.1. Morfometrijska analiza.....	48
4.1.1. Varijabilnost dužine tela.....	48
4.1.2. Analiza glavnih komponenti (PCA) .....	51
4.1.3. Diskriminantna analiza (DA) .....	72
4.1.4. SOM analiza: uticaj abiotičkih faktora na ..... morfometrijsku varijabilnost – modeli vrsta .....	76 76
4.2. Uticaj hidroloških parametara na morfometrijske karaktere .....	95
4.3. Uticaj abiotičkih faktora na populacije odabranih vrsta familije ..... Elmidae.....	97 97
4.4. Filogenetska analiza taksona familije Elmidae područja Balkanskog poluostrva .....	103
4.4.1. Barkodiranje taksona .....	103
4.4.2. Filogenetska stabla .....	105
4.4.3. Filogenetski odnosi sekvenciranih i taksona iz genetičkih baza .....	108
4.5. Genetička varijabilnost vrste <i>Elmis maugetii</i> Latreille, 1802 u Evropi i severnoj Africi.....	112
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>118</b>
5.1. Morfometrijska analiza odabranih vrsta familije Elmidae Balkanskog poluostrva .....	118
5.2. Uticaj hidroloških parametara na morfometrijske karaktere .....	119
5.3. Uticaj abiotičkih faktora na populacije odabranih vrsta elmida .....	122
5.4. Filogenetska analiza taksona familije Elmidae Balkanskog poluostrva.....	126
5.5. Genetička varijabilnost i filogeografija vrste <i>Elmis maugetii</i> Latreille, 1802... ..	127
5.6. Valorizacija faune elmida područja Balkanskog poluostrva .....	131
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>133</b>
<b>7. REFERENCE.....</b>	<b>136</b>
<b>PRILOG 1.....</b>	<b>166</b>
<b>PRILOG 2.....</b>	<b>171</b>

## **UVOD**

### **1.1. Osnovne odlike akvatičnih tvrdokrilaca kao specijalizovane grupe**

Tvrdokrilci spadaju među najraznovrsnije insekatske redove. Do sada je opisano preko 400 000 vrsta, sa oko 170 familija (Jardine, 2010), što predstavlja oko 40% svih poznatih vrsta insekata i 25% svih životinjskih vrsta na Zemlji. Pretpostavlja se da mnogo njih još uvek nije otkriveno i opisano. Naseljavaju skoro sve tipove staništa na Zemlji (Gillot, 2005).

U okviru reda Coleoptera, poznato je više od 13 000 vrsta akvatičnih predstavnika (Short, 2018), što ih svrstava u jednu od glavnih grupa slatkovodnih Arthropoda. Potpuna ili delimična adaptacija na život u slatkoj vodi se desila nezavisno nekoliko puta tokom evolucije tvrdokrilaca. Akvatični tvrdokrilci žive u različitim tipovima slatkovodnih staništa (izvori, potoci, reke, jezera, bare i dr.). Takođe se mogu pronaći u slanim barama u obalskom pojusu mora, ali ne i u morskoj vodi.

Predstavnici tvrdokrilaca, kao najobimnijeg reda insekata pored oponokrilaca (Hymenoptera) i dvokrilaca (Diptera), adaptirani su na veoma različite sredinske uslove (Forbes i sar., 2018). Kako bi preživeli u vodenoj sredini, akvatični tvrdokrilci poseduju specifičnu građu i razvili su morfološke (hidrodinamičan oblik tela, modifikacije trećeg para ekstremiteta za plivanje i dr.) i fiziološke adaptacije (plastron, vazdužni mehur i dr.) koje im omogućavaju stalni ili povremen boravak u vodi. Poznati su i stigobionti iz sledećih familija: Elmidae, Dryopidae, Noteridae, Hydrophilidae i Dytiscidae, kao i vrste koje nastanjuju higropetrična staništa, npr. pojedini predstavnici familija Lutrochidae, Noteridae i dr. (Maier i Short, 2013; Short, 2018; Baca i Short, 2018).

Poznato je šest tipova ekoloških grupa vodenih tvrdokrilaca: „pravi”, „lažni”, fitofilni, parazitski, fakultativni i obalski vodeni tvrdokrilci (Jäch i Balke, 2008). Od navedenih ekoloških grupa, „pravi” vodeni tvrdokrilci naseljavaju potpuno ili delimično vodenu sredinu u jednom od stadijuma životnog ciklusa, ili ceo životni ciklus.

Većina srednjeevropskih vrsta vodenih tvrdokrilaca su univoltine sa reprodukcijom u proleće i prezimljavanjem adulta (Hansen, 1987; Nilsson, 1996). Na

osnovu ovakve životne istorije, bimodalna sezonska dinamika letenja, sa prolećnom disperzijom pre razmnožavanja i letnjom disperzijom novih generacija je očekivana i uočena je više puta (Fernando i Galbraith, 1973; Landin, 1980; Zalom i sar., 1979, 1980; Lundkvist i sar., 2002).

## **1.2. Diverzitet akvatičnih tvrdokrilaca**

Vodene tvrdokrilce možemo naći u svim biogeografskim regionima, a najveća raznolikost je u tropskom području, osim porodica Helophoridae i Haliplidae. Većina vodenih tvrdokrilaca, uzimajući u obzir pojedinačne vrste, nema kosmopolitsko rasprostranjenje, već je značajno izražen lokalni endemizam. U Evropi područje Mediterana se smatra njihovim svojevrsnim centrom endemizma (Mittermeier i sar., 1998, Myers i sar., 2000), gde od ukupnog broja vrsta vodenih tvrdokrilaca na Pirinejskom poluostrvu 20% pripada endemitima (Jäch i Balke, 2008; Ribera, 2000). Zbog svoje velike raznovrsnosti, vodeni tvrdokrilci su korišćeni u identifikaciji područja sa visokim regionalnim biodiverzitetom (Sánchez-Fernández i sar., 2006; Abellán i sar., 2005). Prema studiji Sanchez-Fernandez i sar. (2006), vodeni tvrdokrilci analizirani su kao potencijalni indikatori biodiverziteta u kontinentalnim vodenim ekosistemima u semiaridnom mediteranskom regionu. Mada su se kao grupa pokazali kao dobri indikatori biodiverziteta u jednom geografskom regionu, nisu reprezentativni za obrazce raznovrsnosti svugde, usled biogeografskih i klimatskih ograničenja (Su i sar., 2004), ali mogu biti u regionima sa sličnim sredinskim i ekološkim karakteristikama. Rezultati studije Sanchez-Fernandez i sar. (2006) ukazuju da su vodeni tvrdokrilci dobri indikatori biodiverziteta, i na lokalnoj i na regionalnoj skali, i da se mogu koristiti u monitoringu vodenih ekosistema mediteranskog podneblja. Takođe, rezultati ove studije pomogli su konzervacionim biolozima u određivanju prioritetnih područja za zaštitu u mediteranskom basenu. Posmatrajući ostale grupe makroinvertebrata (npr. Plecoptera, Trichoptera, Ephemeroptera), diverzitet Coleoptera je mnogo konzistentniji između tipova staništa. Coleoptera mogu biti korisni indikatori biodiverziteta ako pokrivaju dovoljno širok geografski opseg (Wilcox, 1984; Caro i O'Doherty, 1999) i nastanjuju širok opseg tipova staništa. Unutar jednog geografskog područja, oni mogu imati visoku „odanost“ staništu, jer odsustvo vodenih Coleoptera, usled uznemiravanja i narušavanja

staništa, može ukazati na odsustvo i nekih drugih vrsta (Panzer i sar., 1995). Vodeni tvrdokrilci takođe pokazuju visok funkcionalni diverzitet i imaju sposobnost da kolonizuju širok spektar staništa, jer uključuju veliki broj vrsta (Ribera i Foster, 1993). Zapravo, zajedno sa predstavnicima reda Heteroptera, oni su jedina grupa koja su u studiji Sanchez-Fernandez i sar. (2006) bila prisutna u svim tipovima staništa.

### **1.3. Uticaj abiotičkih i biotičkih faktora na akvatične tvrdokrilce**

Poznato je da različiti abiotički i biotički faktori utiču na sastav zajednice insekata. Sastav vrsta se menja i diverzitet generalno povećava duž skorašnjih gradijenata, tj. gradijenata onih parametara koji su, vremenski, bili poslednji praćeni (Fairchild i sar., 2000; Suh i Samways, 2005). Na prostorno-vremensku dinamiku populacije vodenih tvrdokrilaca najveći uticaj imaju: fizički i hemijski činioci vodene sredine, trajnost (permanentnost) staništa, potopljenost vegetacije, kompeticija, prisustvo predatora, (prvenstveno riba), kao i interakcija između invertebrata predatora. Abiotički faktori, kao što su hidrološki i hemijski parametri vode predstavljaju važne determinante sastava zajednice vodenih insekata (Klečka, 2008; Eyre i sar., 2009). Posebno se ističe značaj međusobnih interakcija ovih faktora na strukturiranje zajednica, dok je značaj pojedinačnih hemijskih varijabli vode osporen (McPeek, 1990). Pojedini taksoni predatorskih akvatičnih tvrdokrilaca iz familije Dytiscidae dobri su bioakumulatori teških metala u tragovima i indikatori opterećenja vodotoka metalima (Burghelia i sar., 2011).

Uticaj fizičko-hemijskih parametara vode odražava se kao uticaj na fiziologiju vodenih organizama. Najvažniji fizički faktori koji utiču na zajednicu vodenih tvrdokrilaca su: proticaj, tip substrata i hidrogeološke karakteristike vodotoka (Bournaud i sar., 1992; Eyre i sar., 1993; Miserendino i Archangelsky, 2006). Takođe, razni hemijski faktori imaju uticaj na zajednicu, kao što su pH, elektroprovodljivost, alkalitet i koncentracije nutrijenata (npr. Eyre i sar., 1990; Miserendino i Archangelsky, 2006). Svi navedeni parametri variraju duž vodotoka. Vodeni tvrdokrilci u lotičnim staništima obično pokazuju varijacije u sastavu zajednice duž longitudinalnog gradijenta, što znači da je udaljenost od izvorišne zone reke osnovna (Berthélemy, 1964; Bournaud i sar., 1992; Brojer i sar., 2017). Tako je utvrđeno da se broj vrsta akvatičnih

tvdokrilaca povećava longitudinalno, posmatrajući nizvodno počevši od izvora (Eyre i sar., 1993; Elliott, 2008a; Moss, 2010), tj. postoji gradijent longitudinalne distribucije zajednice. Ali koncept „rečnog kontinuma” (Vannote i sar., 1980) ne može biti primenjen na hidrološki specifične reke (Mičetić Stanković i sar., 2018a), kao što je npr. kraška reka Cetina u Hrvatskoj koja useca dubok kanjon, i gde ne postoji longitudinalni gradijent zajednice akvatičnih tvrdokrilaca kao za većinu srednjeevropskih reka.

Hidrološki gradijenti vlažnog područja takođe imaju važnu ulogu u prostornom strukturiranju zajednica vodenih insekata (npr. Tarr i sar., 2005). Pojedine vrste preferiraju privremene vode za reprodukciju (Williams, 2006).

Veoma često, nepravilna površina neorganskog supstrata u potocima (Holomuzki i Biggs, 2003), lišće i ostaci drveća (Palmer i sar., 1996) pružaju skloništa vodenim tvrdokrilcima od trenutnog protoka i omogućavaju preživljavanje tokom visokog vodostaja (Lancaster i sar., 2006). U nepovoljnim uslovima, skloništa mogu zaštititi organizme koji će kasnije ponovo zauzeti područja koja su bila pod uticajem (Rempel i sar., 1999). Istraživanja o uticaju trenutnog strujanja vode i potrazi za skloništima i njihovom uticaju na funkcionalne karakteristike beskičmenjaka (Sibly i Calow, 1989; Sedell i sar., 1990; Lancaster i Hildrew, 1993; Winterbottom i sar., 1997; Franken i sar., 2006) ukazuju na to da korišćenje skloništa igra ključnu ulogu u određivanju sastava vrsta i funkcionalnih karakteristika bentosnih zajednica. Veliki proticaj u potocima poznat je kao glavni faktor koji utiče na strukturu zajednica makroinvertebrata (Melo i sar., 2003). Poznato je da ekstremni vremenski uslovi, kao što su obilne kiše, poplavni talasi i bujice, utiču na bogatstvo taksona u vodenoj zajednici i njihove prostorne obrasce distribucije staništa. U potocima i rekama, hidraulički uslovi mogu imati ključnu ulogu u distribuciji organizama, preko direktnih efekata plavljenja i vučne sile (Weissenberger i sar., 1991; Collier i sar., 1995; Segura i sar., 2013). Sadler i sar. (2004), Bates i sar. (2007) pokazali su da vrste vodenih tvrdokrilaca koje su povezane sa distinktnim mikrostaništima, i na taj način većom heterogenošću mikrostaništa, prikazuju veći diverzitet i mikroprostornu distribuciju kao vrste koje su izložene rečnom sedimentu (engl. *exposed riverine sediments*). Distribucija vrsta uglavnom je povezana sa lateralnim sredinskim gradijentima (veliki gradijent temperature, vlažnosti i učestalosti inundacija), nego sa vidljivim distinktnim mikrostaništima (npr. delovima sedimenta različite granulacije). Takođe, napominju da

kanalisanje, ekstrakcija agregata sedimenta ili regulacija reka najverovatnije imaju negativan uticaj na diverzitet vodenih tvrdokrilaca.

Malo je poznat uticaj biotičkih faktora na zajednicu vodenih tvdrokrilaca. Prostorna distribucija fitofilnih vodenih insekata određena je prostornim promenama gustine vegetacije (de Szalay i Resh, 2000; Tolonen i sar., 2003). Mnogi vodeni tvrdokrilci preferiraju život u vodama sa gustom vodenom vegetacijom, jer im obezbeđuje hrani i zaštitu larvi i imagi (Hebauer, 1988; de Szalay i Resh, 2000), kao i drugim vrstama makroinvertebrata (Nicolet i sar., 2004). Povezanost pojedinih vrsta akvatičnih tvrdokrilaca sa prisustvom vegetacije može biti u vezi sa dostupnošću podloge za adulte kako bi položili svoje ooteke sa jajima, kao i sa pogodnim mestima za odmor i ishranu larvi. S druge strane, vegetacija može pružiti utočište od predatora gde se mogu sakriti, uzimajući u obzir prisustvo, pre svega, riba kao njihovih glavnih predatora.

#### **1.4. Disperzija i plovidba**

Disperzija letenjem jedna je od ključnih karakteristika životne istorije vodenih insekata, naročito u privremenim vodama. Klečka (2008) navodi da je sezonska aktivnost letenja vodenih tvrdokrilaca primarno uslovljena sa dva faktora - temperaturom vazduha i dubinom vode. Većina insekata zahteva spoljašnju toplotu da zatreće svoje mišiće pre samog leta, te stoga ne mogu leteti na veoma niskim temperaturama (Klečka, 2008). Disperzija je glavni mehanizam za suočavanje vodenih insekata sa sušom, a masovan let za vreme perioda presušivanja vode je takođe karakterističan za vodene tvrdokrilce (Wiggins i sar., 1980).

Jedan od faktora koji utiče na aktivnost letenja vodenih insekata je i deterioracija. Naime, pogoršanje uslova u staništu (npr. isušivanje, visoke temperature ili povećana kompeticija) se često smatra pokretačem disperzije, što uzrokuje kasno letnje migracije iz privremenih u trajne vode za prezimljavanje insekata (Popham, 1964; Pajunen i Jansson, 1969; Fernando i Galbraith, 1973; Wiggins i sar., 1980; Hutchinson, 1993). Popham (1964) je ukazao da je kod krupnijih vrsta temperaturni prag za poletanje generalno viši, jer su potrebne veće temperature za pravilno funkcionisanje mišića leta. Hidrološki parametri (npr. fluktuacije vodostaja, dubina vode) i temperatura

vazduha dominantni su pokretači aktivnosti letenja vodenih insekata (Klečka, 2008). Takođe, nekoliko autora je proučavalo dnevne promene u aktivnosti letenja vodenih insekata. Većina vodenih tvrdokrilaca preferira da leti oko/posle zalaska sunca, a manje pre izlaska sunca, ali ne tokom dana (Fernando i Galbraith, 1973; Zalom i sar., 1979, 1980; Csabai i sar., 2006), što se objašnjava dnevnim promenama temperature (Popham, 1964; Pajunen i Jansson, 1969; Landin i Vepsäläinen, 1977; Zalom i sar., 1979, 1980). Nedavni dokazi ukazuju da je detekcija površinske vode ključni mehanizam koji se koristi za orijentaciju vodenih insekata koji migriraju (Schwind, 1991, 1995; Csabai i sar., 2006; Horváth i Kriska, 2008). Zbog toga, dnevne promene u polarotaktičkoj detektibilnosti površinske vode, odnosno sposobnosti vodenih insekata da budu privučeni svetlošću reflektovanom od površine vode, mogu delimično uticati na aktivnost leta vodenih insekata (Csabai i sar., 2006). Neke vrste elmida nemaju sposobnost leta, dok su druge su dimorfne kada su u pitanju krila za letenje, tzv. brahipterne i makropterne forme (Brown, 1987; Shepard, 2019). Moguće je da neke vrste podfamilije Elminae mogu da napuste vodu i možda lete tokom prvih dana ili nedelja života imaga i nakon toga postaju trajno vezane za vodu, jer njihovi mišići za letenje atrofiraju kako bi se obezbedili nutrijenti za produkciju jaja i druge aktivnosti. U svakom slučaju, neke leteće jedinke provode određeni deo života pod vodom (Brown, 1987).

Plovidba predstavlja čest način prenosa kod akvatičnih insekata (West, 1929; Brusven, 1970; Hynes, 1972; Waters, 1972; Bournaud i Thibault, 1973; Reisen, 1977; Newman i sar., 1984; Elliot, 2008b). Larve plove od srednjeg toka do drveta ili kamena uz koji se penju puzenjem. Perez (Perez, 1863) je prvi zabeležio drift larvi elmida i objasnio mehanizam kod vrste *Macronychus quadrituberculatus* Müller, 1806, međutim on je drift opisao kao način za izbegavanje nepovoljnih sredinskih uslova, kao što je niska koncentracija rastvorenog kiseonika u vodi (Perez, 1863). Zrele larve imaju trahealne vazdušne mehure koji mogu da se suze ili prošire pomoću tergosternalnih mišića; oni obezbeđuju funkcionisanje i kontrolu specifične gravitacije tela (Susskind, 1936; Gage, 1983; Steedman, 1983).

## **1.5. Evoluciona biologija akvatičnih tvrdokrilaca**

### **1.5.1. Istorijkska tranzicija staništa**

Insekti postoje već više od 400 miliona godina, a nedvosmisleni dokazi o insektima iz vodene sredine datiraju od pre oko 320 miliona godina (Lancaster i Downes, 2013). Pitanje je kada su tačno i kako insekti počeli da zauzimaju vodenu sredinu, i kako razotkriti ekološke uloge insekata u drevnim vodenim ekosistemima? Paleontološki podaci i fosilni ostaci insekata su od ključnog značaja u otkrivanju njihove evolucione istorije, ali fosilni nalazi su uglavnom nepotpuni. Kako mogu fosilni nalazi da potkrepe naše razumevanje evolucionih događaja? Najstariji fosilni nalazi akvatičnih tvrdokrilaca datiraju iz srednjeg trijasa (oko 240 miliona godina), i to sa područja Sibira i Urala, a plivajući oblici pojavljuju se tokom krede (Grimaldi i Engel, 2005). Najvažniji događaji u evoluciji insekata se uglavnom odnose na više taksonomske kategorije insekata, sa akcentom na evoluciju akvatičnih i semiakvatičnih grupa. Važno je istaći da je istorija i evolucija akvatičnih osobina insekata, kao i biogeografija glavnih vodenih insekatskih grupa otkrivena sa teorijom tektonike ploča (Lancaster i Downes, 2013). Među glavnim pitanjima u evolucionoj biologiji je svakako razumevanje porekla i evolucionih posledica novih osobina koje su se javile kod insekata. Koristeći integrisani pristup (Pallarés i sar., 2017), kombinovani su fiziološki i ekološki podaci sa molekularnom filogenijom na nivou vrste, kako bi se razumela evolucija najčešćih tranzicija staništa kod vodenih makroinvertebrata i to: prelaz između tekućih i stajaćih voda i razvoj tolerancije na salinitet. Kako bi se došlo do odgovora, testirane su makroevolucione posledice tih tranzicija, i to kako stopa diverzifikacije, tako i veličina geografskog opsega rasprostranjenosti. Utvrđeno je poreklo i mehanizam tolerancije na salinitet, njegova moguća interakcija sa tolerancijom prema aridnosti, kao i balans sa drugim biološkim osobinama (Pallarés i sar., 2017).

Svakako je evolucija leta ključna inovacija koja može omogućiti ekstremnu diverzifikaciju insekata. Bez obzira na to, mnoge grupe insekata bogate vrstama imaju evolucionе linije koje ne lete. Zanimljivo je otkriće da gubitak letenja podstiče diverzifikaciju tvrdokrilaca (Ikeda i sar., 2012). Gubitak leta može ubrzati alopatričku

specijaciju usled ograničene disperzivne moći, što može rezultirati visokom stopom specijacije u linijama koje ne lete, a to je ispitano npr. kod familije Silphidae (Ikeda i sar., 2012). Vrste koje ne lete zadržavaju veću genetičku diferencijaciju među populacijama i sadrže veći broj genetički različitih linija od vrsta sposobnih za let, a stopa specijacije vrsta koje ne lete je dva puta veća od onih koje su u stanju da lete. Sposobnost gubitka letenja dešavala se češće kod porodica sa više vrsta, a to se pripisuje velikom broju specijacijskih događaja unutar ovih porodica, uglavnom slučajnih. Pošto je evolucija neletača često, ali ne uvek, povezana sa korišćenjem stabilnih staništa, stabilnost staništa umesto gubitka leta *per se* može intenzivirati specijaciju. Sposobnost gubitka letenja kod različitih vrsta insekata može nastati zbog različitih evolucionih promena u ekološkim osobinama, kao što su izvori hrane i staništa. Zbog toga, hipoteza o diverzifikaciji vrsta gubitkom leta nije povezana sa hipotezom o tipičnosti staništa (Ikeda i sar., 2012). Proces specijacije uz gubitak leta bio bi važan, naročito za tvrdokrilce. Faktor koji je doprineo raznovrsnosti tvrdokrilaca može biti adaptivna radijacija povezana sa diverzifikacijom angiospermi u kredi (Ikeda i sar., 2012). Nadalje, ista studija je otkrila da je adaptivna radijacija porodica tvrdokrilaca prethodila porastu angiospermi, kao i da su različite linije preživele i od tada nastavile da se razdvajaju. S druge strane, u studiji Villastrigo i sar. (2017) dokazano je da su prelazi staništa (tranzicije) mogli biti ključne u evolucionoj istoriji linija Coleoptera. Ova studija obrađuje makroevolucione posledice promene staništa kod plemena Hygrotini i ukazuje da se ovaj tip tranzicija često dovodi u vezu sa evolucijom novostečenih osobina, ili određuje promenu stope diverzifikacije. Vrste koje žive u stajaćim vodama (lentična staništa) su na geološkoj skali manje izdržljive od onih koje žive u tekućim vodama (lotična staništa) pa im je potrebna veća sposobnost disperzije i, stoga, imaju širi domet rasprostranjenja nego one iz tekućica (Ribera i Vogler, 2000). Neki autori su pokazali da se tolerancija na salinitet pojavila u nezavisnim linijama za vreme sušnih perioda (Arribas i sar., 2014). Očekivano je da ove tranzicije između tipova staništa mogu imati neke efekte na šeme diverzifikacije linija, i to tako da bi lotične vrste trebalo da imaju veći evolucijski „preokret“ i uži geografski opseg nego lentične, a ako je tolerancija na salinitet ekstremna ekološka specijalizacija, trebalo bi da je evoluciono nepovratna, ireverzibilna, a stoga i evoluciono mlađa. Lentične populacije akvatičnih tvrdokrilaca su zavisne od migracije

i sposobnosti leta njihovih jedinki, za razliku od lotičnih populacija gde takve funkcionalne osobine nisu od presudnog značaja (Ribera i Vogler, 2000).

U istraživanju Abellán i Ribera (2011) proučavana je geografska varijabilnost vodenih tvrdokrilaca. Dokazano je da su geografska lociranost i filogenija glavne determinante veličine geografskog rasprostranjenja kod vodenih tvrdokrilaca. Grupe blisko povezanih vrsta često imaju velike razlike u veličini geografskog rasprostranjenja, uprkos tome što dele mnoge druge faktore zbog njihovog zajedničkog filogenetskog nasleđa. Korišćeno je deset linija vodenih Coleoptera zapadnog Palearktika. Maksimalne granice geografske širine i dužine bile su pozitivno korelisane sa veličinom areala, tj. vrste na najsevernijim geografskim širinama i najistočnim geografskim dužinama pokazuju najšire areale. U linijama sa lotičnim i lentičnim vrstama, lentične vrste, koje više disperguju, pokazuju veće raspone rasprostranjenja od lotičnih vrsta koje slabo disperguju. Veličina geografskog opsega takođe je pozitivno korelisana sa veličinom bioma kome vrsta pripada, ali nisu pronađeni dokazi o jasnoj povezanosti između veličine areala i starosti vrsta. Zaključci istraživanja ukazuju da je veličina areala vrste oblikovana interakcijom geografskih i ekoloških faktora, sa filogenetskom komponentom koja utiče na oba faktora. Razumevanje faktora koji određuju veličinu geografske lociranosti i areal vrsta je od suštinskog značaja za proučavanje porekla i sastava postojeće biote. Dobijeni rezultati studije Abellán i Ribera (2011) pokazuju da, u ovu svrhu, najrelevantniji podaci mogu biti filogenetska istorija vrste i njena geografska lociranost. Na veličinu areala predstavnika familije Elmidae, kao predominantno lotičnih tvrdokrilaca, najveći uticaj imaju klimatski faktori (Elliot, 2008a).

### **1.5.2. Glacijalni refugijumi i postglacijalna rekolonizacija vrsta**

Pleistocen je poznat po tome što obuhvata periode glacijacije i interglacijacije, koji su smenjivali tokom čitave epohe. Tokom perioda glacijacije, ledeni pokrivač i permafrost proširili su se do geografske širine od približno 52° na jugu, odnosno do 47° na severu (Hewitt, 2004; Lomolino i sar., 2015). Klima je u periodima glacijacije bila mnogo hladnija i suvlja nego u periodima interglacijacije, zbog čega je veći deo kontinenta nepogodan za naseljavanje umerenih i borealnih taksona. Ti taksoni bili su primorani da se povuku na jug do refugijuma na Pirinejskom, Apeninskom i

Balkanskom poluostrvu, ili do područja južno od Kavkaskih planina (Hewitt, 1999; Schmitt, 2007). Važna karakteristika ovih refugijuma bila je njihova izolovanost od srednje Evrope planinskim lancima (Pireneji, Alpi, Dinaridi i Balkanske planine), koji su takođe imali svoje ledene kape. Kao posledica smanjenja areala i geografske izolacije tokom svakog glacijalnog perioda, subpopulacije vrsta koje su nekada bile iste počele su da divergiraju i da se genetički razlikuju od drugih koje su preživele u različitim refugijumima. Tokom perioda interglacijacije, kada su glečeri i permafrost počeli da se povlače, različite linije iz južnih refugijuma započele su kolonizaciju ka severu i proširile svoje areale. Postoji nekoliko široko prihvaćenih scenarija rekolonizacije severnih regiona od strane južnih kolonista, koji se razlikuju u pogledu lokacije refugijuma i pravca disperzionih ruta (Taberlet i sar. 1998; Hewitt, 1999, 2000).

Pokazalo se da je uloga visokih planina kao barijera veoma važna za većinu vrsta (Hewitt, 2004), a za evropski kontinent balkanski refugijum je pružio utočište većini kolonista, jer su Balkanske planine najniže među ostalim planinskim masivima koji su izolovali refugijalna područja. Nakon kolonista sa Balkana, veći deo Evrope kolonizovali su kolonisti sa Pirinejskog poluostrva, dok je Apeninsko poluostrvo obezbedilo najmanje kolonista severnoj Evropi (Hewitt, 1999, 2000). Noviji podaci o visoko pokretnim organizmima, poput ptica i letećih insekata (Wahlberg i Saccheri 2007; Pons i sar., 2016; Drag i sar., 2018; Drovetski i sar., 2018) pokazuju različite obrasce prethodno pretpostavljene kolonizacije severne Evrope.

Osim toga, u zavisnosti od mnogo različitih faktora, brzina rekolonizacije severnih delova može značajno da varira između vrsta i populacija iz različitih refugijalnih područja. Postoje tri različita načina ekspanzije (Hewitt, 2004). Prvi je brza ekspanzija, gde je severna populacija kolonista smanjila raznolikost alela i postoje velika područja genetičke homogenosti (Ibrahim i sar., 1996). „Brzi” obrazac je zabeležen kod mnogih vrsta sa severne hemisfere (Hewitt, 1996; Schmitt i sar., 2002). Ovaj fenomen je takođe poznat kao „*leading-edge*“ kolonizacija, jer je populacijama iz drugih južnih refugijuma teže da se prošire nakon što se popuni prostor (Hewitt, 1993). Drugi način rekolonizacije je sporo širenje ka severu, kod vrsta koje imaju ograničene mogućnosti disperzije. U njihovim populacijama genetička raznovrsnost je velika na severu, i one imaju veće efektivne veličine populacije. Ova dva načina rekolonizacije su u suprotnosti, a treći način rekolonizacije, tzv. „*stepping-stone*“ rekolonizacija, nalazi se

između njih. U dešifrovanju filogeografskih signala određene vrste, potrebno je razmotriti njenu životnu istoriju i kako je ona proširivala i sužavala njen specifični areal (Hewitt, 2004).

Poznato je mnogo studija o filogeografiji insekata i njihovim načinima rekolonizacije Severne Evrope (npr. Schmitt i sar., 2002; Wahlberg i Saccheri, 2007; Drag i sar., 2018), ali oni su uglavnom ograničeni na visoko mobilne vrste. Takođe, nedavne studije molekularne filogenije nekih rodova akvatičnih tvrdokrilaca u pojedinim područjima ukazuju na postojanje većeg broja vrsta i potrebu formiranja grupa vrsta (Gr.). Primer pomenutom je kosmopolitski, hiper-raznovrsni rod *Hydraena* na Mediteranu (Trizzino i sar., 2012). Dosadašnje studije ukazuju i na potrebu resistematizacije taksona u odnosu na prvobitnu determinaciju koja je bazirana isključivo na njihovim morfološkim karakterima.

## **1.6. Opšte karakteristike familije Elmidae**

### **1.6.1. Biologija i ekologija familije Elmidae**

Elmidae su sitni akvatični tvrdokrilici, uglavnom braon ili crni puzeći insekti; opseg veličine adulta je 1,3-8,5 mm, a larvi do 12 mm. Veličina tela adulta kreće se od 1,35 do 1,50 mm kod najsitnijih vrsta, kao što je npr. *Esolus parallelepipedus* (Müller, 1806), do 3,75 do 4,75 mm kod krupnijih vrsta, kao što je npr. *Stenelmis canaliculata* (Gyllenhal, 1808). Telo im je kompaktno sa vrlo dugim nogama i kandžicama kojima se čvrsto prihvataju za podlogu da ih vodena matica ne odnese. Kod pojedinih vrsta telo može biti inkrustrirano epizoičnim dijatomama ili sesilnim protozoama, najčešće roda *Vorticella* (Brown, 1987). Najkrupniji predstavnici (do 8,5 mm) su iz roda *Potamophilus* Germar, 1811. Porodica Elmidae, zajedno sa porodicama Dytiscidae, Hydraenidae, Hydrophilidae, Scirtidae i Gyrinidae spada u „prave” vodene tvrdokrilice (Jäch i Balke, 2008). Larve i odrasle jedinke smatraju se „pravim” vodenim organizmima, što znači da jednom kada uđu u vodu ostaju u njoj do kraja života. Kao što je pomenuto, neki predstavnici potporodice Larinae susreću se u obalskim zonama i zonama prskanja vode. Za razliku od markantnih vodenih tvrdokrilaca, kao što su predstavnici familija Dytiscidae, Gyrinidae i Hydrophilidae, elmide nisu plivači, i ne

dolaze do površine vode kako bi uzeli atmosferski kiseonik. Većina vrsta se sporo pokreće i polako prijanja uz supstrat (Brown, 1987).

Jedna od najvažnijih karakteristika familije Elmidae je posedovanje plastrona, respiratorne strukture koju koriste adulti podfamilije Elminae, i jedino još predstavnici roda *Helichus* (*Pomatinus*) iz familije Dryopidae, što bi moglo ukazivati na konvergentnu evoluciju ove karakteristike (Brown, 1987). Postojanje i održavanje plastrona omogućeno je gustim omotačem od specijalizovanih hidrofugnih seta. Zahvaljujući posedovanju plastrona (pubescentnog hidrofobnog omotača) adulti unose direktno kiseonik iz okolne vode (Cooter i Barclay, 2006; Kodada i Čiampor, 2014). Adultne jedinke održavaju plastron određeno vreme pod znatnim pritiskom vode i mogu ostati potopljene u dobro aerisanoj vodi bez ponovnog izlaska na površinu. Superhidrofobne površine nose vazdušni „film” sprečavajući određene delove tela semiakvatičnih i akvatičnih insekata da ostanu vlažni dok su insekti uronjeni u vodu. Istraživanjem morfologije površina tela insekata koje zadržavaju vazduh zaključeno je, pomoću SEM metode, da sve ovakve površine insekata karakteriše prisustvo seta, mikrotriha, ili njihove kombinacije različite gustine (Balmert i sar., 2011). Kada insekti prvo uđu u vodu, uzimaju sa sobom vazdušni „film” koji pokriva znatan deo njihove telesne površine. Ovaj tanak sloj vazduha funkcioniše kao greben, i u kontaktu je sa vazdušnim prostorom ispod elitri u koji se otvaraju spirakule. Kada se kiseonik ukloni iz ovog rezervoara apsorpcijom organa za disanje, on se zamenuje difuzijom rastvorenog kiseonika iz okolne vode (Brocher, 1912; Harpster, 1941, 1944; Beier, 1948; Thorpe i Crisp, 1949; Thorpe, 1950). Neke Elmidae (npr. vrste roda *Riolus*) dopunjaju plastron iz kiseoničnih mehurića oslobođenih procesom fotosinteze vodenog bilja, a ostali (npr. *Elmis*) ostaju trajno potopljeni bez takvog dodatka sve dok je nivo rastvorenog kiseonika u okolnoj vodi odgovarajući (Brocher, 1912; Hinton, 1939; Thorpe, 1949; Thorpe, 1950). Messner i Langer (1984) pružili su dokaze da se razmena gasova između zatvorenih vazdušnih prostora elitre i okolne vode može dešavati direktno kroz tanke regije kutikule elitri. Iako adulti podfamilije Larinae nemaju plastron i više su riparijalni nego akvatični, ponašanje i stuktura adulta pojedinih tropskih rodova omogućava im da ostanu neograničeno ispod površine vode, gde Bernulijev princip ima ključnu ulogu u formiranju i održavanju velikog respiratornog mehura (Stride, 1955).

Imajući u vidu da se oslanjanju na respiraciju plastronom, većina vrsta podfamilije Elminae su ograničene na vodu koja je skoro zasićena rastvorenim kiseonikom. Uglavnom naseljavaju dobro aerisane poteze vodotoka u kojima voda struji preko kamenite podloge i koji imaju dobру prozračnost. Samo nekoliko vrsta naseljava stajaće vode i obale jezera koje zapljuškuju talasi (Elliot, 2008a). U jezerima i sporo tekućim delovima reke, vrste se mogu sresti u litoralu između kamenja ili šljunka, ali se takođe mogu zakačiti i za akvatične biljke (Brown, 1987). Pojedine vrste žive u specifičnim staništima, kao što su termalni baseni i topla izvorišta, podzemna staništa, higropetrična staništa i strelja koja je u raspadu (Brown, 1987). Pronađene su jedinke koje žive i na dubinama većim od deset metara. Larve nekih vrsta naseljavaju peskovita dna. Jedini stigobiont Palearktika iz ove familije, *Limnius stygius* Hernando, Aguilera and Ribera, 2001 rasprostranjen je samo u Maroku (Jäch i sar., 2016).

Elmide imaju kompleksan životni ciklus koji kod nekih vrsta obuhvata prisustvo i u vodenoj i riparijalnoj zoni, i koji je relativno dug (potrebno je 2-3 godine za razvoj od jaja do stadijuma imagu, Miserendino i Archangelsky, 2006). Adulti žive dugo, ali ne postoje precizni podaci o dužini života jedinki u prirodnim uslovima. U laboratoriji, neke jedinke prežive i nekoliko godina na sobnoj temperaturi, čak i u nepovoljnim uslovima (Cole, 1957; Brown, 1973).

Sve vrste familije Elmidae imaju uglavnom akvatične larve sa analnim škrgama i 5-8 larvalnih stupnjeva, što zavisi od roda. Pupacija se uglavnom uvek dešava van vode. Kod većine vrsta, poslednji larvalni stupanj puza van vode i pupacija se odvija u zemljištu ili ispod kamena blizu vode. Nekoliko vrsta u rekama sa fluktuacijama u nivou vodostaja jednostavno čeka u plitkoj vodi pored ivice reke dok se nivo vode ne povuče i onda se ulutkavaju *in situ* (White, 1978; Seagle, 1980).

Jedan od krupnijih rodova, *Macrelmis* Motschulsky, 1859 jaja polaze pojedinačno, ili u skupinama ispod potopljenih stena ili biljaka u kasno proleće i tokom leta. Razviće jaja traje od jedne do dve nedelje, nakon čega se izlegu mlade larve koje žive od pola do tri godine, zavisno od vrste i temperature sredine. U kasno proleće, poslednji stupanj larve izlazi puzeći na kopno, gde se ulutkava, te se nakon jedne do tri nedelje razvija mlada odrasla jedinka koja prvi i poslednji put leti do vode. Pomenuta trajanja faza životnog ciklusa su manje ili više varijabilna, u zavisnosti od vrste.

Trajanje larvalnog stadijuma kod elmida (6-36 meseci) i broja larvalnih stupnjeva (5-8) takođe zavisi od temperature, kao i od veličine tela i dostupne hrane. Razviće je brže na višim temperaturama; larvalni stadijum severnih populacija određene vrste može da traje i do godinu dana duže. Kada su ostali faktori ujednačeni, kod sitnijih vrsta razviće traje kraće i imaju manje larvalnih stupnjeva nego krupnije (Brown, 1987). Zrele larve se ulutkavaju u zaštićenim mestima iznad linije vode. Koriste različite načine kako bi došli od staništa larve do mesta za ulutkavanje; najjednostavniji način je direktno puzenje, ukoliko je izvodljivo. U potocima čiji nivo vode varira, larve koriste drugi način, koji su demonstrirali White i sar. (1984), a potvrdio Seagle (Seagle, 1980); zrele larve jednostavno čekaju u plitkoj vodi na obodu potoka da se nivo vode spusti kako bi se ulutkale *in situ*. Kao posledica toga, javlja se relativno sinhronizovana emergencija adultnih jedinki.

Adulti severnoameričkih rodova podfamilije Larinae su riparijalni, imaju relativno kratak životni ciklus i ulaze u vodu verovatno samo zbog ovipozicije. Kada su uznemireni, lete lako i brzo, ponekad u roju, u kapljicama vodopada ili slapova. Adulti određenih tropskih rodova su akvatični, ali su razvili drugu respiratornu tehniku koja koristi nešto poput velikog balona. Larve podfamilija su suštinski slične, ali ekologija i ponašanje adultnih jedinki se veoma razlikuju. Odrasle Larinae su prilično pokretne; one lete lako i brzo, za razliku od sporih i vodenih Elmidae (Brown, 1987).

Osim tipa supstrata i brzine strujanja vode, za akvatične tvrdokrilce značajan je i tip supstrata, odnosno staništa gde obitavaju (Eyre i sar., 2003). Predstavnici familija Elmidae, zajedno sa familijama Dytiscidae, Hydraenidae, Hydrophilidae, Scirtidae i Gyrinidae čiji su stadijumi larve i imaga kod većine vrsta akvatični (Jach i Balke, 2008), obično se mogu sresti kako puze po kamenju i drugom čvrstom detritusu u brzotekućim potocima i rekama. Samo nekoliko vrsta se može naći u sporotekućim potocima ili stajaćim vodama. One imaju relativno duge noge za pričvršćivanje za podlogu, koje su i kod larvi i kod adulta dobro sklerotizovane (Brown, 1991; McCafferty, 1983; White i Brigham, 1996).

U vodenim ekosistemima elmide moraju da reše i problem zaštite od predadora. Glavni predatori elmida su salmonidne ribe, dok se drugi beskičmenjaci retko hrane elmidama (Elliot, 2008a). Poznato je da su mahovine jedno od glavnih skloništa za elmide, naročito tokom nepovoljnijih zimskih uslova, a ujedno su i glavni izvor hrane za

njih (Giller i Malmqvist, 1998; Elliott, 2008a). Pojedine vrste elmida imaju i aposematsku obojenost kao vid zaštite (Brown, 1987). Brown (1987) je zabeležio da adulti mnogih severnoameričkih vrsta elmida imaju upadljivu obojenost, sa žutim, naradžastim ili crvenim tačkama ili prugama na njihovim elitrama. To ukazuje da bi mogla biti upozoravajuća obojenost koja odbija njihove potencijalne predatore, što je dokazano pojedinim eksperimentima gde su rakovi, kornjače i ribe ignorisali adultne insekte, ili su ih izbacili ako su ih uneli slučajno sa drugom hranom. Ovo nije slučaj kod adulta i larvi evropskih vrsta elmida, koje se često mogu naći u želucu riba, naročito salmonidnih. Adulti i larve elmida retko su plen drugih predatorskih beskičmenjaka. Ribe ih verovatno konzumiraju tokom drifta, kada su nošene vodenom strujom nizvodno. Međutim, njihova zastupljenost u ishrani riba je uvek niža od one u bentosu, što ukazuje na njihovu slabu dostupnost ribama (Allen, 1941; Elliot, 1967; Maitland, 1967). Na taj način se isključuje njihova međusobna kompeticija. Zauzimanje mikrostaništa može se značajno promeniti prisustvom predatora ili kompetitora, kroz rast odnosa predatora/kompetitora: pojedinci mogu izabrati mikrostaništa u kojima trpe manje rizike da postanu plen, iako ne mogu biti učinkoviti u potrazi za hranom (Sih, 1981; Wellborn i Robinson, 1987; Suutari i sar., 2004). Elmide se hrane biljnim materijalom, algama i detritusom. Malo je poznata ishrana adulta i larvi, ali oni se javljaju kao sakupljači ili strugači koji se hrane uglavnom algama i detritusom (Jones, 1951; Hynes, 1961, 1968).

Veliki uticaj na ekologiju i rasprostranjenje vrsta familije Elmidae u vodenim ekosistemima ima ljudska aktivnost. Najveći antropogeni uticaj na opstanak vrsta familije Elmidae ima zagađenje, pre svega sapunima i deterdžentima koji dovode i do redukcije koncentracije kiseonika u vodi i porasta temperature vode. Zagađenje sapunima i deterdžentima najviše šteti adultima elmida, jer ovako natopljeni agensi oštećuju plastron i tako onemogućavaju insektima da održe ili plastron ili vazdušni mehur (Brown, 1966). Ovo je široko rasprostranjen problem u slabo razvijenim regijama u kojima se potoci koriste za kupanje i pranje veša. U aridnim regionima ovaj problem je još izraženiji, jer se takvo zagađenje koncentriše na izvoru jedino dostupne vode (Brown, 1966).

Na distribuciju vrsta negativan uticaj ima i ekstremno veliki proticaj, naročito bujice. Takođe, negativan antropogeni uticaj odražava se i na morfologiju i tipologiju

obale, kao npr. njeno betoniranje koje onemogućava ulutkavanje mnogih predstavnika akvatičnih makroinvertebrata (Lorenz i sar., 2004), a i elmida (Jäch, 1994), i time direktno utiče na njihov nestanak iz pojedinih staništa. Studija Jäch (1994) jasno ukazuje da je izgradnja nasipa na obalama tekućica u Austriji uzrokovala nestanak vrste *Elmis obscura* (Müller, 1806) u poslednjih 50 godina. Retke primere ugroženosti elmida u prošlosti zabeležio je Brown (1987): žitelji Perua (Lime) su vrstu *Austrelmis condimetarius* (Philippi, 1864) nekada konzumirali kao pastu po imenu “*chiche*”.

### **1.6.2. Elmide kao bioindikatori**

Poznato je da elmide odgovaraju brzo na sredinske promene u vodi, zato se koriste kao biondikatori kvaliteta vode i ekološke funkcionalnosti vodotoka (Brojer i sar., 2017), a i kao bioindikatori klimatskih promena (Elliot, 2008a). Svi slatkovodni ekosistemi se mogu smatrati kao ranjivi na klimatske promene zbog njihove relativne izolacije i fizičke fragmentacije unutar terestričnih predela što znači da mnoge vrste mogu imati limitiranu sposobnost disperzije sa porastom temperature (Woodward i sar., 2010). Elmide se koriste kao indikatori kvaliteta vode, pre svega na osnovu limnosaprobnosti, jer veliki broj vrsta ima saprobne vrednosti i indikatorske težine (Moog, 2002), ali i kao indikatori klimatskih promena i očuvanja staništa (Crowson, 1981; Moog i Jäch, 1995, 2003; Elliott, 2008a). Bradley i Ormerod (2002) su zapazili da je *Elmis aenea* jedna od četiri vrste makroinvertebrata potoka čija abundanca značajno opada sa povećanjem vrednosti Severno-atlantskog Oscilacionog Indeksa za zimu. Pozitivne vrednosti indeksa prate blaže zime, jaki zapadni vetrovi i padavine do 30% iznad godišnjih proseka. Osim toga, u studiji Bradley i Ormerod (2002) navodi se da je moguće da povećanje proticaja, koje je povezano sa jakim pljuskovima, dovodi do smanjenja abundance elmida. Hoffsten (2003) je istraživao borealne potoke u Švedskoj i dokazao da izrazito jakе zime redukuju gustinu i taksonomsku raznovrsnost makroinvertebrata, ali većina vrsta se oporavila nakon tri godine, osim vrsta *Elmis aenea* (Müller, 1806) i *Oulimnius tuberculatus* (Müller, 1806). Spor oporavak ove dve vrste ukazuje da su elmide osjetljive na surove uslove prouzrokovane klimatskim promenama. García-Criado i Fernández-Aláez (2001) su pokazali da su Elmidae zajedno sa Hydraenidae-ama dobri indikatori zagađenja voda koje potiče od

eksploatacije uglja u španskim rekama. Osim toga, osetljive vrste imaju redukovanu longitudinalnu distribuciju duž reka, i ograničene su na njihove gornje tokove.

### **1.6.3. Konzervacione studije familije Elmidae**

Istraživanja familije doprinela su i izradi konzervacionih crvenih lista vrsta i staništa (Brown, 2008). Naime, akvatični tvrdokrilci su relativno zanememareni u konzervacionim istraživanjima, kao ne toliko markantna grupa makroinvertebrata, u odnosu na ostale grupe vodenih beskičmenjaka, pre svega Ephemeroptera i Trichoptera. Stoga je neophodno obratiti više pažnje na inventarizaciju faune ove grupe, prioritetizaciju njihove zaštite, kao i na konzervacioni status taksona, što je u nekim mediteranskim zemljama već pokrenuto, npr. u Španiji (Abellán i sar., 2005) i Maroku (Bennas i sar., 2009). Pristupom integrativne taksonomije, koja uključuje morfometrijske i filogenetske analize, moguće je otkriti kriptički diverzitet. Tako je npr. kod vodenih tvrdokrilaca familije Hydrophilidae otkriven kriptički diverzitet familije u regionu Mediterana, posebno nove vrste u okviru kompleksa vrsta roda *Enochrus*, sa vrlo malim preklapanjem ekoloških niša taksona čiji status ranjivosti prethodno nije bio adekvatno kategorisan (Arribas i sar., 2012a).

Korišćenjem istog pristupa kod elmida ustanovljene su, pre svega morfološke i genetičke distinkcije taksona, koje kod ove grupe akvatičnih insekata nisu bile ranije utvrđene korišćenjem samo morfološkog pristupa. Iz tog razloga je u ovoj doktorskoj disertaciji korišćen integrativni pristup, kako bi se dobili što precizniji podaci kako o raznovrsnosti, tako i o potencijalnoj ugroženosti istraživanih taksona familije Elmidae u Srbiji.

### **1.6.4. Klasifikacija i diverzitet familije Elmidae**

Familija Elmidae pripada nadfamiliji Dryopoidea, infraredu Elateriformia, podplemenu Elmina Curtis, 1830, plemenu Elmini Curtis, 1830, podredu Polyphaga i redu Coleoptera. Raniji nazivi familije su Helmidae i Elminthidae (Steffan, 1963). U pionirskoj resistematizaciji Coleoptera, Crowson (1956) je svrstao familiju Elmidae u podred Polyphaga, nadfamiliju Dryopoidea. Steffan (Steffan, 1958, 1961, 1963) je naziv

familije Elminthidae prvobitno koristio u taksonomskom ključu za britanske Elmidae. Berthélemy (1979) je revidirao argumente da se za familiju Elmidae (ili Elminthidae) koristi jedan naziv - Elmidae. Ovaj poslednji naziv obično je korišćen u severnoameričkoj literaturi, i stoga je logično da se isti naziv koristi sa obe strane Atlantika. Mnogi naučnici su nezvanično usvojili engleski naziv *riffle beetles*, za akvatične driopoidne tvrdokrilce (familija Dryopidae) koji obično naseljavaju tekuće vode, pre svega potoke, posebno plitke brzake i ako nije usvojen zvanični zajednički naziv za *riffle beetles* u sistematici grupe. Pojedini hidrobiolozi ograničavaju naziv *riffle beetles* na pripadnike porodice Elmidae, ili čak podfamilije Elminaе, ali u starijim literaturnim izvorima (Brown, 1987), u ovu familiju su se ubrajali i pripadnici familije Dryopidae koje naseljavaju brzake, zatim rod *Lutrochus* (Lutrochidae, ranije u familiji Limnichidae), kao i predstavnici familije Psephenidae. U novije vreme termin *riffle beetles* odnosi se isključivo na familiju Elmidae (Elliot, 2008a). Reč “*riffle*” je izvorno severnoamerička i označava kameniti potez potoka ili reke sa brzim tokom vode. Hrvatski naziv familije je slapoljubi (Mičetić Stanković i sar., 2015).

U okviru familije Elmidae postoje dve podfamilije: Elminaе i Larainaе.

**Podfamilija Elminaе.** Pripadnici ove podfamilije su najviše vezani za vodenu sredinu od svih Coleoptera. U odnosu na ostale delove sveta, u Evropi se sreće relativno mali broj rodova podfamilije Elminaе. U Evropi živi 42 vrste iz 10 rodova ove podfamilije (Jäch, 2013; Jäch i sar., 2016): *Elmis* Latreille, 1798, *Stenelmis* Dufour, 1835, *Macronychus* Müller, 1806, *Limnius* Illiger, 1802, *Oulimnius* Gozis, 1886, *Esolus* Mulsant & Rey, 1872, *Riolus* Mulsant & Rey, 1872, *Normandia* Pic, 1900, *Dupophilus* Mulsant & Rey, 1872 i *Grouvellinus* Champion, 1923.

**Podfamilija Larainaе (Larinaе).** Glavne karakteristike podfamilije su da predstavnici nemaju plastron, adulti su dobri letači i žive kraće od podfamilije Elminaе. Mnogi pripadnici ove podfamilije mogu da se označe kao *riffle beetles* samo tokom larvalnog stadijuma, kada su u potpunosti akvatični i ne razlikuju se kao grupa od larvi Elminaе. Kao i kod podfamilije Elminaе, najveći broj vrsta podfamilije Larainaе ne nalazimo u

Evropi. Jedini evropski predstavnik podfamilije je rod *Potamophilus* Germar, 1811 sa vrstom *Potamophilus acuminatus* (Fabricius, 1792).

U svetu je iz ove porodice poznato oko 1500 vrsta (Jäch i sar., 2016), ali pretpostavlja se da mnoge još uvek nisu otkrivene. Oko 80 vrsta zabeleženo je u Severnoj Americi (White i Brigham, 1996), a 43 vrste u Evropi (Jäch i sar., 2016); ovaj broj se smanjuje u zapadnim i severnim granicama Evrope, sa 11 vrsta iz 8 rodova u Britaniji (Holland, 1972; Berthélemy i Olmi, 1978), od kojih su mnoge retke. Četiri najčešće vrste familije Elmidae u Velikoj Britaniji su: *Elmis aenea*, *Esolus parallelepipedus* (Müller, 1806), *Limnius volckmari* i *Oulimnius tuberculatus* (Holland, 1972). Ovo su takođe jedine četiri vrste koje su registrovane u Irskoj (Berthélemy i Olmi, 1978; Ashe i sar. 1998; Jäch i sar., 2016), a tri od njih (sve osim *E. parallelepipedus*) su zabeležene u Norveškoj (Ødegaard i sar., 1996). Stoga se javlja oskudnost vrsta i smanjeni diverzitet ove familije na zapadnim i severnim rubovima evropskog kontinenta (Elliot, 2008a). U Hrvatskoj je registrovano 23 vrste (Mičetić Stanković i sar., 2015), u Austriji 21, u Mađarskoj 16, a u Italiji 27 vrsta (Jäch i sar., 2016). U Srbiji je do sada sa sigurnošću potvrđeno 15 vrsta iz ove familije (Novaković i sar., u pripremi), a deo obrađenog materijala publikovan je u radu Novaković i sar. (2020a).

U sklopu morfometrijske studije elmida Balkana, odabrana su dva roda: *Limnius* i *Elmis*. U Evropi je rasprostranjeno 7 vrsta roda *Limnius*: *Limnius colchicus* Delèze, 1963, *Limnius opacus* Müller, 1806, *Limnius muelleri* (Erichson, 1847), *Limnius perrisi* (Dufour, 1843), *Limnius intermedius* Fairmaire, 1881, *Limnius volckmari* (Panzer, 1793) (Jäch i sar., 2016) i *Limnius sulcipennis* Fairmaire, 1881. Podvrsta *Limnius sulcipennis damryi* Fairmaire, 1881 endemična je za Korziku (Francuska), a podvrsta *Limnius sulcipennis sulcipennis* Fairmaire, 1881 za Sardiniju (Italija) (Jäch i sar., 2016). U Evropi živi 9 vrsta roda *Elmis*: *Elmis aenea* (Müller, 1806), *Elmis bosnica bosnica* Zaitzev, 1908, *Elmis latreillei* (Bedel, 1878), *Elmis maugetii* Latreille, 1802, *Elmis obscura* (Müller, 1806), *Elmis perezi* Heyden, 1870, *Elmis rietscheli* Steffan, 1958, *Elmis rioloides* (Kuwert, 1890) i *Elmis syriaca zoufali* (Reitter, 1910) (Jäch i sar., 2016).

### **1.6.5. Taksonomija familije Elmidae**

Dijagnostički karakteri, koji predstavnike familije Elmidae jasno razdvajaju od ostalih familija reda Coleoptera, su sledeći:

- pronotum je dugačak koliko i širok;
- glava i oči su uglavnom skriveni ispod konveksne prednje marge pronotuma;
- noge i kandžice su duge;
- 5.-ti segment svih tarzusa je mnogo duži od ostatka i bulbozan pri vrhu;
- pronotum i/ili elitre sa punkturama i jasno definisanim uzdužnim grebenima (brazdama);
- telo je često pokriveno gustim dlačicama.

Brown (1987) navodi da su glavne morfološke adaptacije vrsta familije Elmidae na ubrzan protok vode: dugi ekstremiteti sa razvijenim tarzalnim kandžicama koje im omogućavaju da se čvrsto prihvate za podlogu u brzotekućim vodama (Friday, 1998), kao i oblik tela koji nije toliko hidrodinamičan (Slika 1), za razliku od familija akvatičnih tvrdokrilaca koje aktivno plivaju i disperguju u vodi, npr. Dytiscidae, Hydrophilidae i dr.



Slika 1. *Elmis aenea* (Müller, 1806), imago. Foto: B. Novaković

Familija Elmidae uključuje u potpunosti akvatične vrste (i larvalni i adultni stadijumi žive u vodi), ali mnoge vrste imaju semiakvatične adulte (Jäch, 1998; Kodada i Jäch, 2005). Ove poslednje su grupisane u podfamiliju Larinae, karakterističnu po kratko živećim adultima, većim i manje kompaktnim telom pokrivenim manje gustim i nemodifikovanim mekanim pubescentnim dlakama, dok su prve navedene većinom potpuno akvatične i imaju kompaktno telo sa ventralno modifikovanim setama. Pre same identifikacije, jedinke su u velikoj meri često obložene neorganskim, organskim materijalom ili dijatomama, te ih treba očistiti. Većinu vrsta familije nije moguće identifikovati do vrste dok se ne izoluju muški polni organi, *aedoeagi* (sing. *aedoeagus*). Muški polni organi su visokospecifično građeni za pojedine vrste omogućavajući njihovu pouzdanu identifikaciju.

#### **1.6.6. Taksonomske karakteristike roda *Limnius* Illiger, 1802**

Rod *Limnius* karakterišu uzdužne brazde na elitrama, formirane kao nizovi punktura, ali bez izraženih bočnih prstenova. Veličina habitusa je u opsegu 1,9-3,5 mm (Alonso i d'Alys, 2018). Svi međuprostori elitri su ravnomerno blago zakrivljeni, samo kod nekih krupnijih vrsta sedmi intersticijalni je u osnovi nešto izraženiji i formira uglove u obliku ramena, u suprotnom su uvek prilično zaravnjeni. Pokrilca su obično veća i ravnomerno zakrivljena (Lompe, 2014). Elitre i sve interstrije na elitrama su ravnomerno blago zakrivljene i ne formiraju bočne pronotalne grebene kao kod drugih robova familije Elmidae - *Oulimnius*, *Dupophilus*, *Esolus*, *Riolus* i *Normandia* (Alonso i d'Alys, 2018).

Pronotum je sa dva uzdužna grebena (brazde), koja se obično spajaju u prednjem delu i nisu povezani sa poprečnim grebenom ispred njegove osnove. Oni zatvaraju centralno polje otvoreno na prednjoj i zadnjoj strani, i blago su zakrivljeni u obliku luka. Mali i uski grebeni pronotuma su duži nego širi, a uzdužni grebeni su uski, duži nego širi, ne šire se do elitri, već se sužavaju prema *scutellum*-u, a osnove vratne ploče ispred njih nisu oštре (Lompe, 2014; Alonso i d'Alys, 2018). Struktura *aedoeagus*-a i *paramerae*-a je *species*-specifična (Olmi, 1976).

### **1.6.7. Taksonomske karakteristike roda *Elmis* Latreille, 1798**

Rod *Elmis* Latreille, 1798 odlikuju dva uočljiva uzdužna prstena na svakoj eltri. Bočna ivica eltri u zadnjoj trećini je glatka ili slabo punktirana. Nemaju elitralne strukture, tzv. kobilice. Bočni grebeni pronotuma spajaju se pre njegove osnove u poprečnom profilu (Lompe, 2014). Grebeni na pronotumu su zakriviljeni idući ka njegovom zadnjem delu. Na sredini pronotuma punkture su obično grube i retke, a između punktura uočavaju se sjajne površine. Poprečna brazda kod sitnijih vrsta može da ima izbočinu u sredini, i da formira i dva udubljenja koja su manje izražena (Alonso i d'Alys, 2018). Veličina habitusa se kreće od 1,6 do 2,4 mm (Lompe, 2014). Telo je više punktirano idući ka zadnjem delu. Antene su obično smeđe boje, primetno zatamnjene prema vrhu, kod pojedinih vrsta svetlige. Struktura *aedoeagus-a* i *paramerae-a* je species-specifična (Olmi, 1976). Kod nekih vrsta prisutne su *papillae* na unutrašnjoj ivici *paramerae-a*. Pojedini članci ekstremiteta su malo do umereno zadebljali (Alonso i d'Alys, 2018).

## **1.7. Istraženost familije Elmidae**

Dosadašnje objavljene studije integrativne taksonomije, koja uključuje morfološke, morfometrijske i filogenetske analize taksona, obuhvatile su, samo pojedine taksone ili grupe drugih familija vodenih tvrdokrilaca, ali nisu analizirane korelacije sredinskih faktora sa morfometrijskom varijabilnošću vrsta. Takve morfometrijske studije su, npr., roda *Enochrus* familije Hydrophilidae (Arribas i sar., 2012a), ili studija evolucione morfologije struktura glave i filogenije pojedinih predstavnika familije Hydraenidae (Beutel i sar., 2003). Postoji jako mali broj publikovanih studija koji se odnose na morfometriju predstavnika familije Elmidae (Segura i sar., 2013), a nisu poznate studije o uticaju fizičkih i hemijskih parametara na morfometrijsku varijabilnost predstavnika ove familije. Takođe, i za ostale familije akvatičnih tvrdokrilaca ne postoji veliki broj morfometrijskih studija, npr. za Gyrinidae (Cook i sar., 2006).

Nasuprot pomenutim, poznate su mnoge ekološke, taksonomske i filogenetske studije predstavnika familije Elmidae (npr. Jäch, 1998; Jäch i sar., 2005; Kodada i Jäch, 2005; Boukal i sar., 2007, Brown, 2008; Elliot, 2008a; Čiampor i sar., 2009; Čiampor i Kodada, 1998, 2010). U novije vreme opisan je znatan broj novih vrsta ove familije, naročito iz tropskih regija (npr. Čiampor i Čiamporová-Zaťovičová, 2008; Manzo i Archangelsky, 2012; Linský i sar., 2019). Međutim, za područje Srbije, Hrvatske i Balkanskog poluostrva postoji relativno mali broj studija o elmidama (Mičetić Stanković, 2012; Mičetić Stanković i sar., 2015, 2018a,b, 2019; Novaković i Mesaroš, 2014; Novaković i sar., 2016, 2020a,b,c). Novi nalazi i ekološke karakteristike retke vrste elmide u Srbiji, *Macronychus quadrituberculatus* Müller, 1806 publikovane su u radu Novaković i sar. (2020b). Vrste familije Elmidae na području Srbije ranije su proučavane uglavnom u sklopu različitih hidrobioloških studija zajednica makroinvertebrata i biomonitoringa voda. Iz susednih zemalja (Mađarska i Hrvatska) publikovane su ekološke, taksonomske i filogenetske studije o familiji (Csabai i Mora, 2003; Kálmán i sar., 2009; Jovović i sar., 2015; Mičetić Stanković i sar., 2015, 2018a,b, 2019) ili pojedinim njenim predstavnicima, a iz šireg okruženja, iz zemalja srednje Evrope, najviše iz Slovačke, Poljske i Češke Republike (Čiamporová-Zaťovičová i sar., 2007; Čiampor i Čiamporová-Zaťovičová, 2008; Čiamporová-Zaťovičová i Čiampor, 2011; Jaskuła i sar., 2005; Boukal i sar., 2007).

Pojedine vrste familije Elmidae su, sa stanovišta molekularne filogenije slabo istražene, dok za pojedine postoji veći broj filogenetskih studija. Danas se u BOLD (<https://www.barcodinglife.com>) i NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)) bankama gena još uvek ne nalaze podaci o svim vrstama, te tek predstoji barkodiranje predstavnika familije. Generalno, taksonomija familije Elmidae još uvek nije u potpunosti razjašnjena (Kodada i Jäch, 2005). U novije vreme kod određenih taksona izvršene su taksonomske revizije, i do nivoa grupe vrsta (Čiampor i Kodada, 1998, 2010), kao i Katalog vrsta familija Elmidae i Protelmidae u svetu (Jäch i sar., 2016), na osnovu novorevidirane sistematike.

## **1.8. Upotreba mitohondrijalnih gena u filogenetskim analizama tvrdokrilaca**

Mitohondrijalni genomi su široko korišćeni u rekonstrukciji filogenije tvrdokrilaca ili grupa nadfamilija tvrdokrilaca (npr. Sheffield i sar., 2008, 2009; Cameron i sar., 2009; Kim i sar., 2009; Pons i sar., 2010; Song i sar., 2010; Timmermans i Vogler, 2012; Haran i sar., 2013; Gillett i sar., 2014). Iako su ovi podaci doprineli rešavanju interne filogenije, unutar pojedinih podfamilija, familija, i u manjem stepenu nadfamilija, oni obično ne daju konačne rezultate i mogu biti sporni za više taksonomske kategorije, npr. podredove, infraredove i superfamilije, usled heterogenosti u sastavu baza i stope varijacije između baznih parova (Song i sar., 2010).

Postojeće studije molekularne filogenije tvrdokrilaca na širokoj skali bazirane su na podacima DNK sekvenci ribozomalnih jedarnih gena (28S, 18S) i/ili mitohondrijalnih gena (COI, COII, 16S, mitohondrijalnih genoma) (Shull i sar., 2001; Caterino i sar., 2002; Vogler, 2005; Hunt i sar., 2007; Hunt i Vogler, 2008; Sheffield i sar., 2008, 2009; McKenna i Farrell, 2009; Song i sar., 2010; Bocak i sar., 2014; McKenna i sar., 2015). Navedene studije zasnovane su na podacima o manjem broju gena, nekada četiri ili manje gena (osim onih baziranih na mitohondrijanom genomu koje uzimaju u obzir samo jednu povezanu grupu gena) i sadrže mnogo nedostajućih podataka, što rezultira u matricama u kojima neke kombinacije taksona koji nedostaju „maskiraju” podatke i filogenetski „signal”. Karakteristično je da je podrška nodusima u rezultujućim filogenijama slaba; molekularni podaci o uzorcima nekih podgrupa tvrdokrilaca, kao što je npr. podred Archostemata, su obično veoma ograničeni, a i ukorenjavanje i *outgroup*-e (engl.) su često problematične, ili malo istražene. Ipak, ovi setovi podataka zajedno predstavljaju veliki ideo poznatih podfamilija tvrdokrilaca, a u nekim od ovih studija, npr. Hunt i sar. (2007), McKenna i Farrell (2009) i Bocak i sar. (2014), prikazuju se neke od „najgušćih” takson-uzorkovanih filogenija dostupnih za bilo koji taksonomski red insekata. Kod Bocak i sar. (2014) ima više od 8000 terminala.

Ranije, uporedne molekularne filogenetske studije tvrdokrilaca koje uključuju podatke jedarnih protein-kodirajućih (NPC) gena nisu bile korišćene, iako se pokazalo da pomažu u rešavanju mnogih problematičnih odnosa kod tvrdokrilaca (Wild i Maddison, 2008; McKenna i sar., 2009; McKenna, 2011a, 2011b). Nedostatak prajmera

i protokola za amplifikaciju i sekvenciranje ovih gena tvrdokrilaca doprineo je njihovoj relativno retkoj upotrebi na višim taksonomskim nivoima, što se vidi, pre svega, u studijama Wild i Maddison (2008) i McKenna i sar. (2009) koje su omogućile da javno budu dostupni mnogi od prajmera i protokola za NPC i druge gene, u okviru *Beetle Tree of Life* (BToL) projekta. I pored toga, mnogi NPC geni ostaju teški za amplifikaciju, i/ili sekvene određenih grupa tvrdokrilaca, usled velike evolucione divergencije tvrdokrilaca, kao i velike varijabilnosti evolucione stope između taksona.

Savremenim metodama molekularne sistematike ustanovljeno je da su mnoge vrste bile pogrešno klasifikovane na osnovu morfološke sličnosti, a da su zapravo nesrodne i genetički različite. U takvim slučajevima, filogenetske analize bazirane na molekularnim podacima ne poklapaju se sa klasičnom taksonomijom koja se vodi morfološkim karakterima, tako da su u novije vreme izvršene revizije mnogih taksona na osnovu genetičkih kriterijuma.

Filogenetske analize obuhvataju korišćenje DNK-baziranih tehnika (koriste se specifične sekvene DNK i porede kod različitih vrsta). Inicijativa “*The Barcode of Life Data System*” (BOLD) nastala je 2007. godine sa ciljem formiranja jedinstvene baze referentnih dijagnostičkih DNK barkodova za potrebe molekularne identifikacije taksona carstva Animalia. Metoda DNK barkodiranja se zasniva na sekvenciranju standardizovanog fragmenta gena mitohondrijalne (mt) citohrom c oksidaze, podjedinice I (COI) (Hebert i sar., 2003; Ratnasingham i Hebert, 2007), koju odlikuje visoka interspecijska i niska intraspecijska varijabilnost omogućavajući tako pouzdanu identifikaciju taksona (Ratnasingham i Hebert, 2007). Identifikacija taksona DNK barkodiranjem, kao metodom molekularne taksonomije, često je neophodna ukoliko taksone nije moguće pouzdano identifikovati na osnovu karaktera spoljašnje morfologije, ali i kao potvrda morfološke identifikacije taksona. Odabir odgovarajućih molekularnih markera je prvi korak u analizi. Prilikom molekularnih analiza i komparacije, moraju se odabrati delovi genoma vrsta koji su informativni za dalju rekonstrukciju.

Metoda barkodiranja DNK takođe je veoma korisna u istraživanjima elmida, posebno u slučajevima morfološki sličnih vrsta (Čiampor i sar., 2009; Čiampor i Kodada, 2010). Iako se podaci o barkodiranju taksona ove familije povećavaju, taksoni sa područja Balkanskog poluostrva su i dalje slabo pokriveni.

## 2. CILJEVI

Imajući u vidu pretpostavke, da će se ispitivane vrste međusobno razlikovati na osnovu morfometrijskih karaktera, na koje imaju uticaj izmereni sredinski faktori, i da ispitivane vrste reflektuju uslove u staništu, a samim tim i sveprisutne i stalne promene vrednosti abiotičkih faktora, pre svega fizičkih i hemijskih parametara vode, da hidraulički pritisak vode utiče na veličinu jedinki (model vrsta *Elmis maugetii*), da postoji mala geografska varijabilnost analiziranih COI fragmenata mitohondrijalne DNK ispitivanih taksona kao i da bi područje Balkanskog poluostrva predstavljalo značajan pleistocenski refugijum za elmide i bilo početno područje koridora rekolonizacije pojedinih vrsta elmida u Evropi (model vrsta *Elmis maugetii*), doktorska disertacija „Morfometrijska i filogenetska analiza vrsta familije Elmidae (Insecta: Coleoptera) Balkanskog poluostrva“ realizovana je u skladu sa sledećim ciljevima:

- Određivanje intra- i interpopulacione varijabilnosti odabranih vrsta familije Elmidae (Insecta: Coleoptera) sa područja Balkanskog poluostrva na osnovu analiziranih morfometrijskih karaktera
- Na osnovu morfometrijske analize proučiti i potvrditi interspecijsku varijabilnost ispitivanih vrsta poznatu iz literaturnih izvora
- Analizirati gradijent uticaja sredinskih (fizičkih i hemijskih) faktora na morfometrijske karaktere i strukturu populacija odabranih vrsta familije Elmidae
- Utvrđivanje korelacije hidroloških parametara (vodostaj, proticaj i dubina uzorkovanja) i morfometrijskih karaktera vrste *Elmis maugetii* Latreille, 1802
- DNK barkodiranje taksona familije Elmidae Balkanskog poluostrva
- Određivanje genetičkih distanci između ispitivanih taksona familije Elmidae (Insecta: Coleoptera) sa područja Balkanskog poluostrva
- Utvrđivanje genetičke varijabilnosti analiziranih jedinki u odnosu na jedinke taksona poznatih iz genetičkih baza (BOLD, NCBI)
- Utvrđivanje filogenetskih razlika ispitivanih taksona familije Elmidae (Insecta: Coleoptera) sa područja Balkanskog poluostrva i filogenetskih razlika u odnosu na susedna područja u Evropi

- Određivanje genetičke varijabilnosti vrste *Elmis maugetii* Latreille, 1802 u Evropi i severnoj Africi

### **3. METODOLOGIJA RADA I MATERIJAL**

#### **3.1. Metode uzorkovanja**

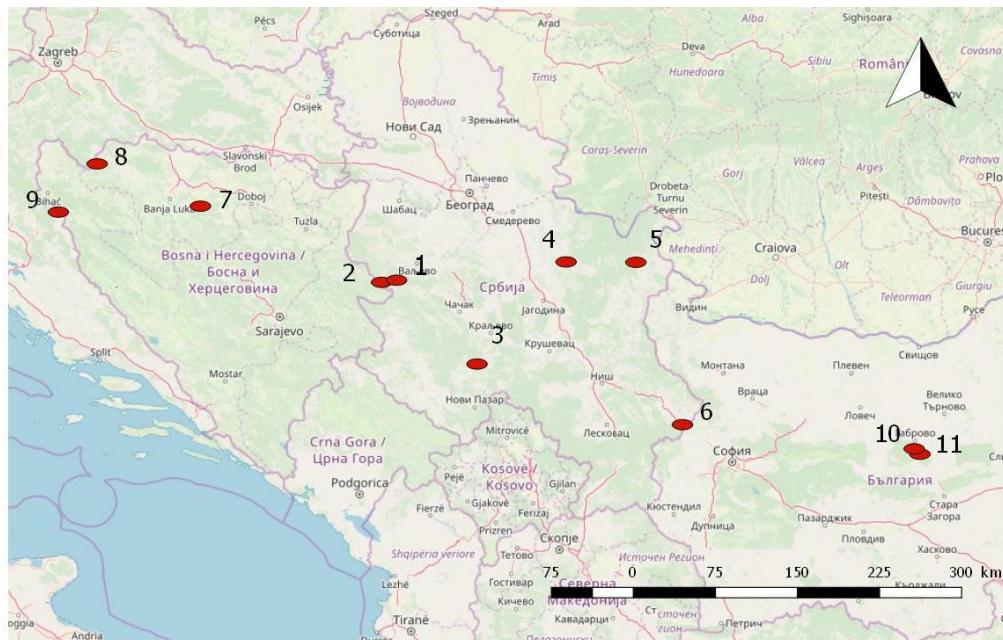
Uzorkovanje je izvršeno standardizovanom ručnom bentosnom mrežom, dimenzija 25 x 25 cm i promera okaca 500 µm, a organizmi su i dodatno sakupljeni pomoću pincete sa različitih tipova podloga (detalji su opisani u Novaković i sar., 2016). Uzorkovanje je izvršeno sa svih tipova dostupnih mikrostaništa – multihabitatni pristup (Hering i sar., 2004; AQEM Consortium, 2002), i dodatno primenom *kick & sweep* tehnike uzorkovanja (AQEM Consortium, 2002). Primenjeni su sledeći standardi za uzorkovanje makrozoobentosa – SRPS EN 27828: 2009, SRPS EN 16150: 2013, SRPS EN ISO 10870: 2013 i EN 27828:1994/ISO 7828: 1985. Za morfometrijsku analizu uzorci su uzeti iz tri države Balkanskog poluostrva (Srbija, Bosna i Hercegovina - entiteti Republika Srpska, Federacija Bosne i Hercegovine, i Bugarska). Jedinke roda *Limnias* uzorkovane su sa 11 lokaliteta (10 vodotokova, Slika 2), a roda *Elmis* sa 7 lokaliteta (6 vodotokova, Slika 2). Vrednosti izmerenih fizičko-hemijskih parametara na lokalitetima uzorkovanja dati su Tabeli 1 u Prilogu 1. Kako bi bilo pokriveno što šire geografsko područje, sa različitim biogeografskim odlikama, a samim tim se ustanovila i veća potencijalna morfometrijska varijabilnost, odabrani su taksoni iz staništa koja se nalaze na prelazima limnofaunističkih regiona. Delineacija limnofaunističkih regiona data je prema Illies, 1978. Obuhvaćeni su sledeći limnofaunistički regioni: 5 (dinarski zapadni Balkan), 7 (istočni Balkan) i 10 (Karpati). Odabранe su reke na prelazu limnofaunističkih regiona 7 i 5 (Mlava), na prelazu limnofaunističkih regiona 7 i 10 (Zamna), u istočnoj Srbiji, kao i reke Kozijata i Sivjak (zapadna Bugarska) koje pripadaju slivu reke Jantre koja predstavlja glavni hidrografski čvor koji razdvaja reke crnomorskog i egejskog sliva. Glavni hidrografski čvor Jantre preseca teritoriju nacionalnog parka „Bulgarka“. Nacionalni park „Bulgarka“ pokriva centralni deo Stare planine (Balkan), tj. severne padine planine Šipke i Triavna, kao i susedne delove Balkanskih planina. Ukupna dužina hidrografskog čvora unutar granica nacionalnog parka je oko 55 km. Struje površinskih voda u parku odlaze u reku Jantru na sever, i u

reku Tundžu na jug. Najveći deo teritorije nacionalnog parka „Bulgarka” (89%) se nalazi unutar slivnog područja reke Jantre (MEW, 2014).

Tabela 1. Osnovni podaci o lokalitetima uzorkovanja odabranih vrsta roda *Limnius* i *Elmis* područja Balkana za morfometrijsku analizu

Kod	Lokalitet/Vodotok	Sliv	Država/ Entitet	Geografske koordinate (N, E)	Nadmorska visina (m)	Dominantni tipovi podloge	Limnofauni stički region
1	Pašna Ravan/Trešnjica	Drine	Srbija	44° 08' 21.0" 19° 39' 50.0"	888	mezolital, makrolital, akal, argilal	5
2	Gornja Trešnjica/Trešnjica	Drine	Srbija	44° 07' 21.0" 19° 30' 02.0"	210	makrolital megalital, mezolital, fital	5
3	Đakovo/Studenica	Ibra	Srbija	43° 28' 44.9" 20° 32' 25.0"	434	megalital, makrolital, mezolital, ksilal	5
4	Gornjak/Mlava	Dunava	Srbija	44° 16' 55.8" 21° 30' 36.0"	156	makrolital, megalital, akal, psamal, argilal	7, prelaz ka 5
5	Plavna/Zamna	Dunava	Srbija	44° 16' 44.8" 22° 16' 15.1"	313	makrolital, mezolital, mikrolital	7, prelaz ka 10
6	Mrvine/Gaberska Reka	Nišave	Srbija	42° 59' 50" 22° 46' 42"	574	makrolital, megalital, mezolital, fital	7
7	Velika Šnjegotina/Šnjegotina	Ukraine	BiH/Repu blika Srpska	44° 42' 56.26" 17° 31' 38.06"	247	mikrolital, akal, mezoitral, ksilal	5
8	Novi Grad/Sana	Une	BiH/Repu blika Srpska	45° 2' 35.00" 16° 24' 9.00	130	mikrolital, akal, psamal, argilal, pelal, fital	5
9	Bijelila/Una	Save	BiH/Feder acija Bosne i Hercegovi ne	44° 40' 11.46" 15° 58' 49.48"	275	megalital, makrolital mezolital mikrolital, psamal, argilal	5
10	Kozijata/nizvodno od hidroelektrane „Maluša”	Jantre	Bugarska	42° 48' 15.68" 25° 18' 10.29"	524	makrolital, mezolital, megalital	7
11	Ezeroto/Sivijk	Jantre	Bugarska	42° 45' 40.35" 25° 21' 52.80"	782	mezolital, detritus, makrolital, megalital, psamal, mikrolital	7

Za određivanje geografskih koordinata i nadmorske visine lokaliteta na terenu korišćeni su GPS uređaji tipa Garmin Geko. Mapa lokaliteta urađena je u softveru QGIS v2.18.8 (Slika 2).



Slika 2. Lokaliteti uzorkovanja odabranih vrsta rodova *Limnius* i *Elmis* na području Balkanskog poluostrva za morfometrijsku analizu: Srbija (1-Pašna Ravan/Trešnjica, 2-Gornja Trešnjica/Trešnjica, 3-Đakovo/Studenica, 4-Gornjak/Mlava, 5-Plavna/Zamna, 6-Mrtvine/Gaberska Reka); Bosna i Hercegovina (7-Velika Šnjegotina/Šnjegotina, 8-Novi Grad/Sana, 9-Bijelila/Una); Bugarska (10-Kozičata/nizvodno od hidroelektrane „Maluša”, 11-Ezeroto/Sivjak).

Na Slici 3 prikazana su tipična staništa predstavnika familije Elmidae na Balkanskom poluostrvu.



Slika 3. A) Studenica/profil Đakovo, jugozapadna Srbija; B) Gaberska Reka/profil Mrtvine, jugoistočna Srbija. Foto: B. Novaković

Prethodnim istraživanjima makroinvertebrata, u sklopu programa monitoringa statusa voda Agencije za zaštitu životne sredine Republike Srbije, ustanovljeno je da predstavnici rodova *Limnius* i *Elmis* u vodotoku uglavnom preferiraju zonu hiporitrala, te su na osnovu toga uzimani uzorci iz staništa gde bi se očekivala njihova najveća brojnost.

### **3.2. Laboratorijska obrada materijala**

Identifikacija vrsta izvršena je pomoću ključeva za identifikaciju (Olmi, 1976; Berthelemy i Olmi, 1978; Friday, 1988; Lompe, 2014; Alonso i d'Alys, 2018), na osnovu karaktera spoljašnje morfologije. S obzirom da je utvrđena velika morfološka varijabilnost među jedinkama istih vrsta roda *Elmis* (Mičetić Stanković i sar., 2015), analizirane jedinke su prikazane kao *conformis* – cf. Svi uzorci su analizirani pomoću stereomikroskopa Carl Zeiss SteREO Discovery.V8 (Carl Zeiss GmbH, Austrija) i Leica MS5 (Leica Microsystems) u Nacionalnoj laboratoriji Agencije za zaštitu životne sredine, Ministarstva zaštite životne sredine u Beogradu.

### **3.3. Morfometrijska analiza**

Morfometrija predstavlja „istraživanje problema veličine i oblika morfoloških celina korišćenjem statističkih metoda, po pravilu različitih multivariantnih procedura, na osnovu podataka dobijenih merenjima” (Rohlf, 1990; Rohlf i Marcus, 1993). Morfometrija je konceptualno povezana sa morfologijom na jednoj strani, i evolucionim procesima na nivou genoma i razvića koji imaju uticaja na fenotip, na drugoj strani. U oblasti sistematike, metodama morfometrije se istražuje varijabilnost karaktera unutar i između grupa, utvrđuje se nivo morfoloških razlika, kao i filogenetski odnosi između grupa (Ivanović i Kalezić, 2013).

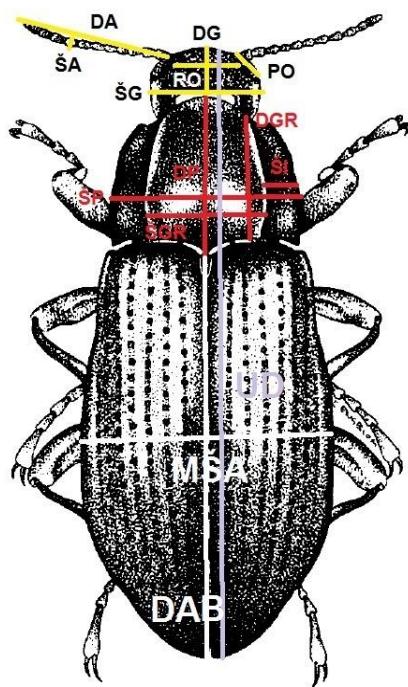
U ovom istraživanju korišćena je metoda tradicionalne morfometrije (Marcus, 1990; Rohlf, 1990). Tradicionalna (ili multivariantna) morfometrija je spoj

kvantitativne morfologije, koja daje ulazne podatke, i multivariatnih statističkih metoda kojima se obrađuju ti podaci. Podaci su uglavnom spoljašnje mere morfoloških celina, ali i unutrašnje dimenzije morfoloških celina koje se istražuju disekcijom ili nekim radiografskim metodama (Oxnard, 1978). Do podataka se dolazi najčešće merenjem dužinskih karakteristika (morfometrijskih varijabli). Tradicionalna morfometrija oslanja se na korišćenje dužinskih mera (tj. mera rastojanja).

Za morfometrijsku analizu, kao i za ispitivanje uticaja fizičko-hemijskih parametara na strukturu populacija odabranih vrsta, uzorak je obuhvatio 358 adultnih jedinki roda *Limnius* Illiger, 1802: *Limnius volckmari* (Panzer, 1793), *Limnius intermedius* Fairmaire, 1881, *Limnius opacus* Müller, 1806 kao i 333 adultne jedinke roda *Elmis* Latreille, 1798: *Elmis cf. aenea* (Müller, 1806), *Elmis cf. maugetii* Latreille, 1802 i *Elmis cf. rioloides* (Kuwert, 1890).

### **3.3.1. Morfometrijski karakteri i morfometrijski indeksi**

Za morfometrijsku analizu ukupno je odabранo 13 dužinskih (linearnih) karaktera na glavi, pronotumu i abdomenu (dorzalno). Kriterijumi za odabir karaktera bili su konzervativnost i informativnost pri poređenju različitih vrsta. Odabrani morfometrijski karakteri na primeru adulta vrste *Limnius volckmari* prikazani su na Slici 4. Na glavi - dužina glave (DG), širina glave (ŠG), rastojanje između očiju (RO), prečnik oka (PO), dužina antena (DA), širina antena (ŠA). Na pronotumu - dužina pronotuma (DP), širina pronotuma (ŠP), dužina grebena sa strane (DGR), širina polja na pronotumu između grebena (ŠGR), širina od bočne ivice grebena do ivice pronotuma (ŠI). Na abdomenu - dužina abdomena (DAB) i maksimalna širina abdomena (MŠA). Takođe, merena je i dužina tela jedinki (UD).



Slika 4. Odabrani karakteri za morfometrijsku analizu na primeru vrste *Limnius volckmari* (ilustracija vrste preuzeta iz Nilsson, 1996)

Formirana su tri morfometrijska indeksa: indeks odnosa dužine i širine glave (OD), odnosa dužine i širine pronotuma (OP) i odnosa dužine i maksimalne širine abdomena (ODŠ). Analizirani morfometrijski parametri za svaku vrstu prikazani su u Tabelama 2-5 u Prilogu 1. Na osnovu navedenih morfometrijskih karaktera i morfometrijskih indeksa utvrđen je stepen populacione varijabilnosti šest vrsta rodova *Limnius* i *Elmis*.

Urađena je i procena greške merenja (merna nesigurnost): za 10 adultnih jedinki vrste *Limnius volckmari* sa lokaliteta Gornjak/Mlava ponovljeno je merenje dužine tela. Procenjena greška merenja jedinki izražena je ukupnom mernom nesigurnošću.

U sklopu statističke obrade rezultata procene merne nesigurnosti morfometrijskih merenja korištene su sledeće formule (Holló, 2012):

Formula za određivanje srednje vrednosti dužine jedinki ( $\bar{x}$ ):

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

,gde je  $x_i$  dužina tela  $i$ -te izmerene jedinke, a  $n$  broj izmerenih jedinki.

Formula za izračunavanje standardne devijacije (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n} - \bar{x}^2}$$

Formula za izračunavanje relativne standardne devijacije (RSD):

$$\% RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

Formula za izračunavanje standardne greške srednje vrednosti dužine jedinki ( $SG\bar{x}$ ):

$$SG\bar{x} = t_{n-1} \times \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

$t_{n-1}$  - studentova t vrednost određena za 95% nivo pouzdanosti

$t$  - statistička vrednost dobijena na osnovu referentnih izračunavanja i zavisi od broja ponovljenih analiza (uzima se iz tablice)

95% limit pouzdanosti:

$$\bar{x} \pm SG\bar{x}$$

Formula za izračunavanje merne nesigurnosti:

$$MN = \frac{SG\bar{x}}{\bar{x}} \times 100$$

Merna nesigurnost prvog merenja:

Srednja vrednost dužine jedinki ( $\bar{x}$ ): 3,053

Standardna devijacija (SD): 0,037

Relativna standardna devijacija (RSD): 1,2%

95% limit pouzdanosti:  $3,053 \pm 0,037$

Merna nesigurnost ( $MN_1$ ): 1,21%

### Merna nesigurnost drugog merenja:

Srednja vrednost dužine jedinki ( $\bar{x}$ ): 3,102

Standardna devijacija (SD): 0,050

Relativna standardna devijacija (RSD): 1,606%

95% limit pouzdanosti:  $3,102 \pm 0,037$

Merna nesigurnost ( $MN_2$ ): 1,19%

Ukupna merna nesigurnost:  $MN_1 + MN_2 = 1,21\% + 1,19\% = 2,40\%$

### **3.3.2. Određivanje inter- i intraspecijske varijabilnosti**

Za određivanje inter- i intraspecijske varijabilnosti ispitivanih taksona korišćene su: analiza glavnih komponenti (PCA), diskriminantna (DA) i SOM (*Self-Organizing Map*) analiza.

#### **3.3.2.1. Analiza glavnih komponenti (PCA) i diskriminantna analiza (DA)**

Za određivanje populacione varijabilnosti različitih vrsta, kao i unutar vrsta, korišćena je jednofaktorska neparametarska ANOVA (XLSTAT za MS Excel 2013) sa 95%-nim intervalom poverenja ( $p \leq 0,05$ ). *Post-hoc* Tukey HSD test podataka, sa nivoom značajnosti 0,05, pri intervalu poverenja od 95%, korišćen je za utvrđivanje statističke značajnosti razlika svih analiziranih morfometrijskih parametara kod ispitivanih vrsta elmida, tj. da su svi uzorci dovoljno raznoliki da bi se moglo pristupiti daljim statističkim analizama. Za procenu interspecijske varijabilnosti taksona korišćene su dve multivarijantne statističke metode: analiza glavnih komponenti - PCA (ter Braak i Prentice, 1988) i diskriminantna analiza - DA (Lachenbruch i Goldstein, 1979). PCA i DA analiza urađene su u softverskom programu Statistica v6.0 (StatSoft Inc, 2001).

### 3.3.2.2. SOM (*Self-Organizing Map*) analiza

Kako bi se što verodostojnije prikazala intraspecijska morfometrijska varijabilnost karaktera analiziranih vrsta familije Elmidae i odredili modeli povezanosti morfometrijskih karaktera sa sredinskim faktorima, korišćene su Kohonenove veštačke neuronske mreže, poznate kao samoorganizujuće mape (SOM; Kohonen, 1982). Kao i kod analize glavnih komponenti (PCA), na osnovu ANOVA i *post-hoc* Tukey HSD testa sa 95%-nim intervalima poverenja, odnosno nivoima značajnosti 0,05 dokazano je da postoje statističke značajne razlike svih morfometrijskih parametara (indeksa) analiziranih vrsta koje su uzete u obzir za konstrukciju SOM.

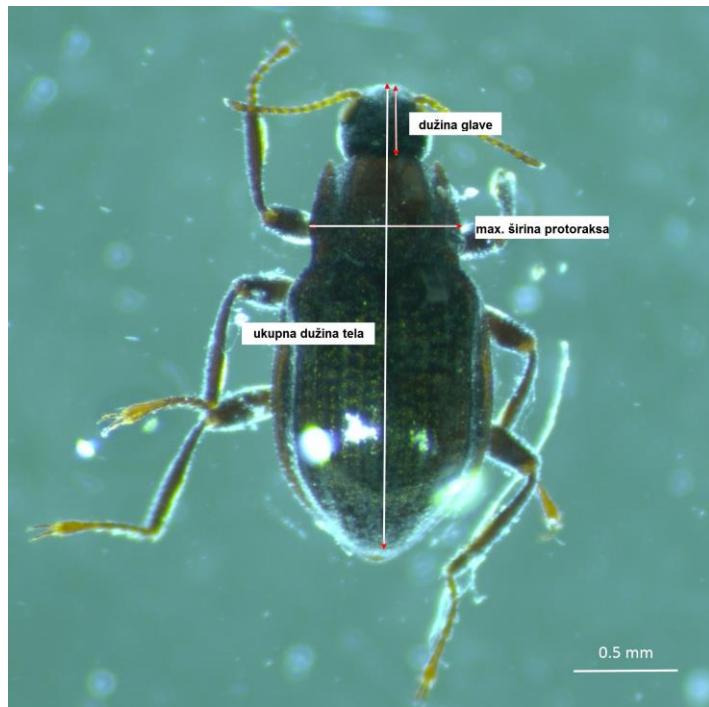
SOM je ordinaciona metoda koja se koristi za modeliranje i vizualizaciju, preslikavajući linearne i nelinearne veze i prikazujući ih grafički u vidu niskodimenzionalnog prostora (neuromreže) korišćenjem visokodimenzionalnog seta podataka. Struktura SOM-a se sastoji iz dva sloja: ulazni i izlazni (Kohonenov) sloj. Izlazni sloj ima strukturu obilka dvodimenzionalne rešetke izgrađene od izlaznih heksagonalnih neurona. Tačke predstavljaju varijabilne neurone ulaznog sloja. Distanciranost u mreži je mera razlike modela, tj. dva heksagonalna neurona će imati sličnije modele u odnosu na neurone koji su pozicionirani na suprotnom kraju mreže. Rezolucija mreže, odnosno broj neurona u izlaznom sloju, veoma je bitna za što pouzdaniji prikaz gradijenta odgovarajućeg karaktera. Glavna prednost SOM metode je sposobnost modeliranja nelinearne veze između varijabli, i da je manje osetljiva na uticaj ekstremnih vrednosti (Park i sar., 2004).

U svrhu određivanja geografske pozicioniranosti jedinki vrsta sa različitim lokalitetima, kao i što pouzdanije procene intraspecijske varijabilnosti i njenog vizuelnog prikaza u odnosu na uticaj sredinskih faktora na morfometrijske parametre vrsta rodova *Limnius* i *Elmis*, konstruisan je model svake vrste na osnovu SOM mape. Prilikom konstrukcije SOM, kao pasivni faktori uzeti su sledeći tipovi abiotičkih faktora: geografski (pripadnost lokalitetu), orografski [nadmorska visina (m)], fizički [temperatura vode (°C), pH vrednost, elektroprovodljivost (μs/cm)] i hemijski [koncentracija rastvorenog kiseonika u vodi (mg/l), procenatualna zasićenost vode kisonikom i koncentracija nitrata (mg/l)]. Za navedene parametre, prikazane su skraćenice na konstruisanim samorganizujućim mapama: nadmvis, T, pH, EC, DO,

%O<sub>2</sub> i NO<sub>3</sub>. Kao aktivni faktori posmatrani su dužinski karakteri u morfometrijskoj analizi: dužina glave (DG), širina glave (ŠG), rastojanje između očiju (RO), prečnik oka (PO), dužina antena (DA), širina antena (ŠA), dužina pronotuma (DP), širina pronotuma (ŠP), dužina grebena sa strane (DGR), širina polja na pronotumu između grebena (ŠGR), širina od bočne ivice grebena do ivice pronotuma (ŠI), dužina abdomena (DAB) i maksimalna širina abdomena (MŠA), kao i tri morfometrijska indeksa - indeks odnosa dužine i širine glave (OD), odnosa dužine i širine pronotuma (OP) i odnosa dužine i maksimalne širine abdomena (ODŠ). Na osnovu pasivnih (abiotičkih) i aktivnih (morfometrijskih) faktora konstruisane su neuronske mreže za svaku vrstu i utvrđena vizuelna korelacija intenziteta morfometrijskih parametara i sredinskih faktora.

### **3.3.3. Morfometrijska varijabilnost karaktera u odnosu na hidrološke parametre**

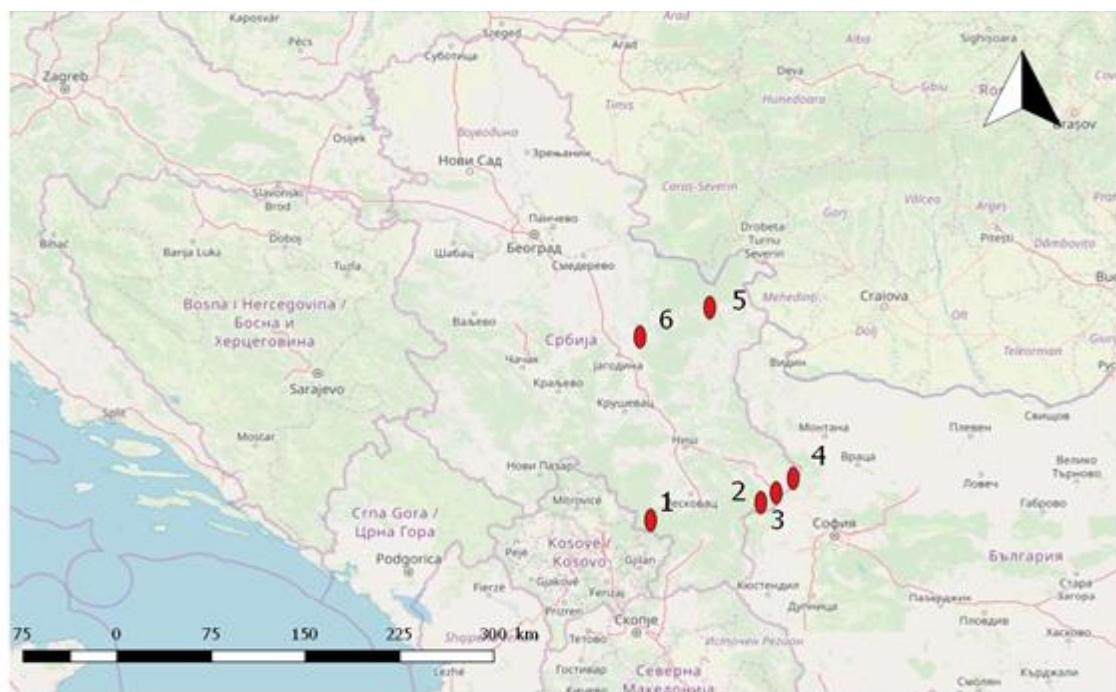
Kako bi se ustanovila korelacija veličine jedinki i parametara hidrološkog režima vodotoka (vodostaja i proticaja), kao i dubine uzorkovanja, analizirani su sledeći morfometrijski karakteri: dužina glave, maksimalna širina protoraksa i dužina tela, na jednoj vrsti - *Elmis maugetii* (Slika 5). Vrsta *E. maugetii* izabrana je kao model zato što je najčešća vrsta familije u Srbiji (Novaković, 2020c).



Slika 5. *Elmis maugetii* Latreille, 1802 - imago: odabrani morfometrijski karakteri.

Foto: B. Novaković

Ukupno je obrađeno 155 adultnih jedinki vrste *E. maugetii*, uzorkovanih na 6 profila vodotokova u Srbiji (Slika 6) u sklopu redovnih godišnjih programa monitoringa, koji su sproveli Agencija za zaštitu životne sredine i Republički Hidrometeorološki zavod tokom 2014. i 2015. godine. Na obrađenim lokalitetima dodatno su izmereni fizički i hemijski parametri relevantni za vrste familije Elmidae. Osnovni podaci o lokalitetima uzorkovanja dati su u Tabeli 2. Delineacija limnofaunističkih regiona data je prema Illies, 1978. Obuhvaćeni su sledeći limnofaunistički regioni: 5 (dinarski zapadni Balkan), 6 (helenski zapadni Balkan), 7 (istočni Balkan) i 10 (Karpati). Mapa lokaliteta urađena je u softveru QGIS v2.18.8 (Slika 6).



Slika 6. Lokaliteti uzorkovanja vrste *Elmis maugetii* u Srbiji: 1-Tulare/Tularska Reka, 2-Trnski Odorovci/Jerma, 3-Mrvine/Gaberska Reka, 4-Krivi Dol/Visočica, 5-Crnajka/Crnajka, 6-Manastir Manasija/Resava

Tabela 2. Osnovni podaci o lokalitetima uzorkovanja vrste *Elmis maugetii*

Profil	Tulare/Tularska Reka	Trnski Odorovci/Jerma	Mrvine/Gaberska Reka	Krivi Dol/Visočica	Crnajka/Crnajka	Manastir Manasija/Resava
Kod	1	2	3	4	5	6
Datum uzorkovanja	25.08.2015.	29.08.2014.	26.10.2015.	27.10.2015.	10.08.2015.	13.10.2014.
Geografske koordinate (N, E)	42.801646 21.573031	42.928617 22.626114	42.997375 22.772657	43.101183 22.935356	44.305918 22.137954	44.100469 21.470769
Nadmorska visina (m)	412,0	573,0	464,8	813,4	152,0	211,5
Dominantni tipovi podloge	mezolital	makrolital, mezolital	makrolital, mezolital	mezolital	mezolital	makrolital, mezolital

Nastavak tabele 2. Osnovni podaci o lokalitetima uzorkovanja vrste *Elmis maugetii*

Profil	Tulare/Tularska Reka	Trnski Odorovci/Jerma	Mrtvine/Gaberska Reka	Krivi Dol/Visočica	Crnajka/Crnajka	Manastir Manasija/Resava
Limnofaunistički region	6	7, prelaz ka 6	7	7	7, prelaz ka 10	7, prelaz ka 5
Temperatura vode (°C)	16,7	15,2	9,9	7,2	22,4	14,4
Zasićenost vode O <sub>2</sub> (%)	96	99	83	92	105	94

Kako bi se ustanovila veća potencijalna morfometrijska varijabilnost analizirane vrste, obuhvaćene su reke na prelazu limnofaunističkih regiona 7 i 6 (Jerma, jugoistočna Srbija), na prelazu limnofaunističkih regiona 7 i 10 (Crnajka), kao i na prelazu limnofaunističkih regiona 7 i 5 (Resava), u istočnoj Srbiji. Uzorkovanje jedinki izvršeno je primenom iste metodologije kao kod uzoraka za morfometrijsku analizu. Proticaj je meren različitim tipovima hidrometrijskih krila, u zavisnosti od tipa vodotoka i gradijenta protoka. Odabrani lokaliteti nalaze se uglavnom u brdsko-planinskim regionima, sa tipičnim staništima za elmide.

Za procenu korelacije sredinskih (hidroloških) faktora i ispitivanih morfometrijskih karaktera korišćena je metoda linearne regresije sa 95%-nim intervalom poverenja (Kenney i Keeping, 1962).

### 3.4. Uticaj abiotičkih faktora na populacije elmida

Za populacionu analizu odabranih vrsta rodova *Limnius* i *Elmis*, kao i korelacije sastava populacija i ekoloških (abiotičkih) faktora u odnosu na sredinske (fizičko-hemijske) faktore, korišćena je kanonijska korespondentna analiza (CCA) (ter Braak, 1986; ter Braak i Verdonschot, 1995; Palmer, 2000; Karadžić, 2013). Primenom ove metode dobija se grafički prikaz položaja jedinki u odnosu na kanonijske ose. Dužina vektora predstavlja njegovu značajnost u sredinskom gradijentu. Prva kanonijska varijabla je osa (*Principal axis 1*) koja se u skaliranom prostoru poklapa sa najvećim

razlikama između srednjih vrednosti grupa, a druga kanonijska varijabla, tj. osa (*Principal axis 2*) opisuje u najvećoj mogućoj meri preostale razlike između srednjih vrednosti grupa (ter Braak, 1986; ter Braak i Verdonschot, 1995; Palmer, 2000).

Ispitivanje odnosa strukturiranosti populacija odabranih vrsta elmida i fizičko-hemijskih parametara sredine izvršeno je na istom odabranom setu uzoraka sa 11 lokaliteta za rod *Limnius*, kao i istom odabranom setu sa 7 lokaliteta za rod *Elmis* (ukupno 27 uzoraka) koji su korišćeni za morfometrijske analize.

Odabir najznačajnijih faktora uticaja izvršen je primenom prethodne (engl. *forward*) selekcije, uz korišćenje Pearson-ovog korelacionog testa u okviru CCA analize. Primenom prethodne selekcije, zasnovane na Pearson-ovom korelacionom testu ( $p \leq 0,05$ ), utvrđen je gradijent uticaja fizičko-hemijskih parametara na populacije odabranih vrsta i omogućen odabir najznačajnijih parametara. Na ovaj način odabранo je šest od svih sredinskih parametara [(temperatura ( $^{\circ}$ C), pH, elektroprovodljivost (EC,  $\mu$ S/cm), rastvoren kiseonik ( $O_2$ , mg/l), procenat zasićenja vode kiseonikom ( $O_2$ , %) i nitrate ( $NO_3^-$ , mg/l)], koji su zatim analizirani primenom kanonijske korespondentne analize (CCA) i analiziran je gradijent uticaja sredinskih (fizičko-hemijskih) faktora na populacije vrsta roda *Limnius* i *Elmis*.

Monte Carlo permutacioni test (1000 permutacija,  $p \leq 0,05$ ) korišćen je kako bi se proverila statistička značajnost sume svih *eigen*-vrednosti pojedinačnih faktora. Kanonijska korespondentna analiza (CCA) urađena je u statističkom programu Flora (Karadžić, 2013).

### **3.5. Molekularne i filogenetske analize**

Metoda barkodiranja DNK (Hebert i sar., 2003) korišćena je za molekularnu identifikaciju taksona. Priprema uzoraka za molekularne analize urađena je u Zoološkoj laboratoriji Instituta za proučavanje biljaka i biodiverzitet Slovačke akademije nauka u Bratislavi. Organizmi koji su bili konzervirani u 96%-nom etanolu prethodno su isušeni i iz njih je ekstrahovan alkohol. DNK je ekstrahovana pomoću komercijalno dostupnog kita, innuPREP Dna Mini Kit (Jena) prema protokolu prozvođača. Prajmeri LCO-1490 (sekvenca 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') i HCO-2198 (sekvenca 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer i sar., 1994) korišćeni su za

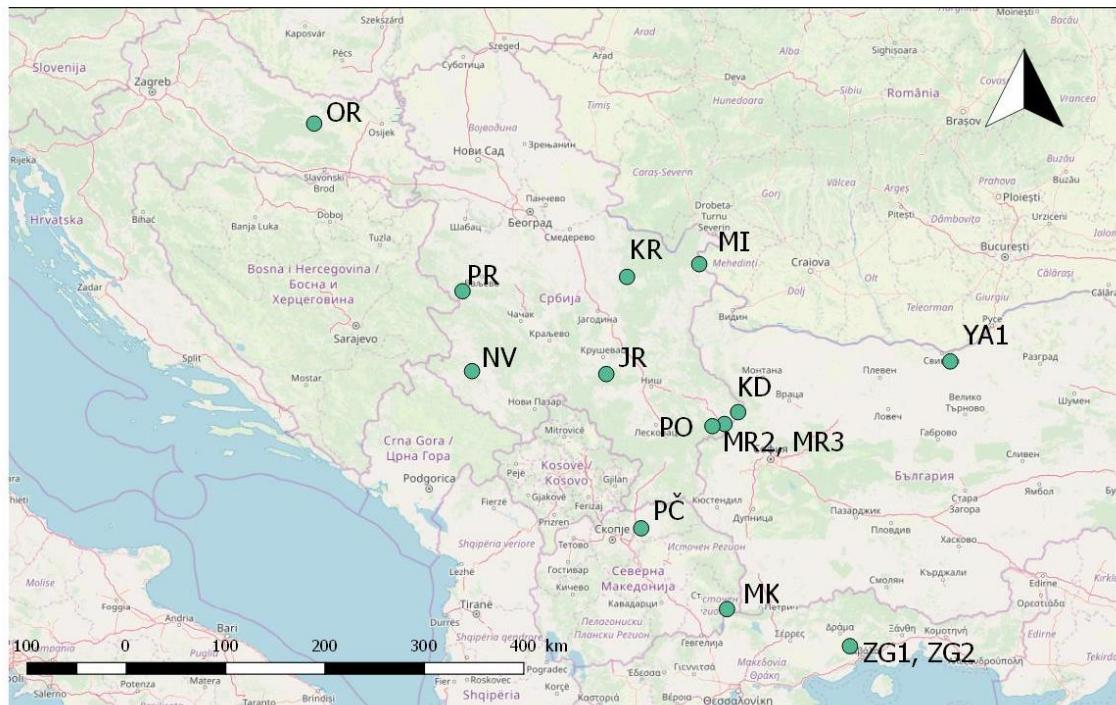
amplifikaciju barkodirajućeg regiona subjedinice 1 citohrom oksidaze mitohondrijalne DNK (COImtDNA). PCR je urađena u zapremini od 25  $\mu$ l smeše za reakciju koja sadržala 1 x GoTaq<sup>TM</sup> reakcioni pufer (Promega), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP smesu (BioLabs), 0.2  $\mu$ M svakog prajmera, 0.75 jedinica of GoTaq polimeraze (Promega) I 3-5  $\mu$ l templejta DNK, a smeša je dopunjena demineralizovanom vodom do finalne zapremine. Uslovi za PCR amplifikaciju bili su: inicijalna denaturacija na 95°C u trajanju od 2 min; 38 ciklusa na 95 °C 40 sec; vezivanje prajmera na DNK na 46°C 40 sec; elongacija na 72°C 50 sec, i finalna elongacija na 72°C u trajanju od 10 minuta. Amplifikacija je testirana na horizontalnom 1%-nom agaroznom gelu prečišćenom pomoću egzonukleaze I i FastAP<sup>TM</sup> „brze” termosenzitivne alkalne fosfataze (ThermoFischer Scientific) prema specifikacijama proizvođača. PCR produkti amplifikacije poslati su na sekvenciranje u Macrogen Europe Inc. (Amsterdam). Kako bi se dobili pouzdaniji rezultati, fragmenti su sekvencirani bidirekciono. Kreirani su skupovi sledova prednjih i reverznih sekvenci, a konačna obrada rezultata urađena je u programu Sequencher v5.1, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA <http://www.genecodes.com>. Odabir najboljeg "substation" modela (GTR+I+G) i filogenetske analize urađene su u programu MEGA v7, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Kumar i sar., 2016).

Filogenetska stabla konstruisana su na temelju COI-5P gena. Neukorenjeno filogenetsko stablo konstruisano je korišćenjem metode maksimalne verovatnoće (*maximum-likelihood*), sa 61 uzorkom Elmidae iz BOLD baze <https://www.barcodinglife.com> i novosekvenciranim uzorcima. Pouzdanost grananja testirana je na temelju 500 "bootstrap" replikata. Za identifikaciju taksona pojedinačnih uzoraka korišćen je "*BOLD Identification Engine*" (kao pouzdana potvrda pripadnosti pojedinoj vrsti smatra se 99-100% podudarnost sa određenom sekvencom u BOLD bazi). Drugo filogenetsko stablo konstruisano je metodom *neighbor-joining* u programu MEGA v7 (Kumar i sar., 2016). na osnovu Kimura-2-parametar (K2P) distanci (Kimura, 1980) uz aLRT-SH-like podršku za grane u stablu. Poravnanje nukleotidnih sekvenci sprovedeno je online programom MAFFT, Multiple Sequencer Alignment Software v7 (Katoh i Standley, 2013), a uz zadate postavke i u programu BioEdit v7.2.5, Informer Technologies, Inc. Poravnanje nukleotidnih sekvenci sprovedeno je online programom MAFFT, Multiple Sequencer Alignment Software v7

(Katoh i Standley, 2013), a uz zadate postavke i u programu BioEdit v7.2.5, Informer Technologies, Inc. Genetičke udaljenosti jedinki, između i unutar taksona, izračunate su metodom Kimura-2-parametar (K2P) distanci (Kimura, 1980) u programu MEGA v7 (Kumar i sar., 2016).

Uzorci koji nisu identifikovani u BOLD bazi (<https://www.barcodinglife.com>), naknadno su blastovani u NCBI GenBank bazi nukleotida ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)). Konačna filogenetska stabla obrađena su u programima FigTree v1.4 (Rambaut, 2012) i Adobe Photoshop CS5, Adobe Inc. Podaci o uzorcima taksona koji su korišćeni u konstrukciji filogenetskih stabala prikazani u Tabeli 1 (Prilog 2).

Uzorci za filogenetsku analizu uzeti su sa 13 lokaliteta iz 5 zemalja Balkanskog poluostrva: Srbija, Hrvatska, Bugarska, Severna Makedonija i Grčka (Slika 7). Kako bi se pokrilo što veće geografsko područje i razmotrila veća potencijalna genetička varijabilnost taksona, obuhvaćene su reke dva sliva: crnomorskog i egejskog, kao i reke na prelazu različitih limnofaunističkih regiona. Prateći podaci o lokalitetima za filogenetsku analizu taksona Elmidae područja Balkanskog poluostrva dati su u Tabeli 3. Delineacija limnofaunističkih regiona data je prema Illies, 1978. Obuhvaćeni su sledeći limnofaunistički regioni: 5 (dinarski zapadni Balkan), 6 (helenski zapadni Balkan), 7 (istočni Balkan), 10 (Karpati), 11 (mađarske nizije) i 12 (pontska provincija). Mapa lokaliteta urađena je u softveru QGIS v2.18.8 (Slika 7).



Slika 7. Lokaliteti za filogenetsku analizu taksona familije Elmidae sa područja Balkana: Srbija (MI-Mihajlovac/Zamna, KR-Krepoljin/Krepoljinska Reka, MR2, MR3-Mrtvine/Gaberska Reka, KD-Krivi Dol/Visočica, PO-Poganovo/Jerma, PR-Pašna Ravan/Trešnjica, NV-Nova Varoš/Zlošnica, JR-Buci/Jastrebačka (Lomnička) Reka; Hrvatska (OR-Orahovica/Vučica); Bugarska (YA1-Most u Hadžidimitrovu/Studena Reka); Severna Makedonija (PČ-Pčinja nizvodno od Kumanova, MK - Gabrovo, Makedonski Kolešinski vodopadi/Strumica); Grčka (ZG1, ZG2-Ano Kefalari/Zygaktes)

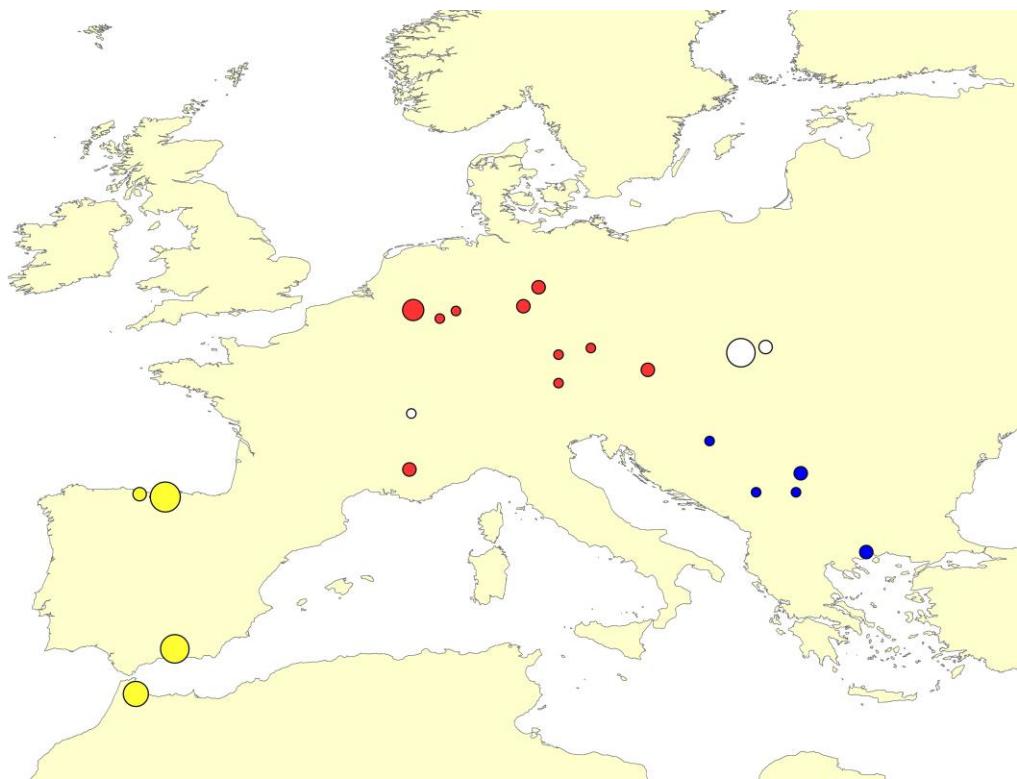
Tabela 3. Prateći podaci o lokalitetima za filogenetsku analizu taksona Elmidae sa područja Balkana

Kod	Lokalitet/Vodotok	Sliv	Država	Geografske koordinate (N, E)	Nadmorska visina (m)	Limno faunistički region
MI	Mihajlovac/Zamna	Dunava	Srbija	44° 22' 11" 22° 28' 39"	68	10
KR	Krepoljin/Krepoljinska Reka	Mlave	Srbija	44° 15' 40" 21° 37' 09"	400	7, prelaz ka 10
MR2, MR3	Mrtvine/Gaberska Reka	Nišave	Srbija	42° 59' 50" 22° 46' 42"	574	7
KD	Krivi Dol/Visočica	Temštice	Srbija	43° 06' 01" 22° 56' 24"	823	7
PO	Poganovo/Jerma	Nišave	Srbija	42° 58' 43" 22° 38' 04"	513	7, prelaz ka 6
PR	Pašna Ravan/Trešnjica	Drine	Srbija	44° 08' 21.0" 19° 39' 50.0	888	5
NV	Nova Varoš/Zlošnica	Uvca	Srbija	43° 27' 17" 19° 46' 36"	839	5
JR	Buci/Jastrebačka (Lomnička) Reka	Dulenske Reke	Srbija	43° 25' 46" 21° 22' 23"	505	5
OR	Orahovica/Vučica	Karašice	Hrvatska	45° 33' 0.864" 17° 53' 58.164"	150	11, prelaz ka 5
YA1	Most u Hadži dimitrovu/Studena Reka	Jantre	Bugarska	43° 32' 18" 25° 27' 44"	35	12, prelaz ka 7
PČ	Pčinja nizvodno od Kumanova	Vardara	Severna Makedonija	42° 5' 7.224" 21° 47' 14.891"	282	6
MK	Gabrovo, Makedonski Kolesinski vodopadi/Strumica	Strume	Severna Makedonija	41° 22' 8.832" 22° 48' 26.819"	467	7, prelaz ka 6
ZG1, ZG2	Ano Kefalari/Zygaktes	Egejskog mora	Grčka	41° 2' 18.348" 24° 16' 9.335"	61	7, prelaz ka 6

### 3.5.1. Populaciono-genetičke analize vrste *Elmis maugetii* Latreille, 1802

Kod vrste *Elmis maugetii* analizirani su populacioni-genetički parametri i određene genetičke razlike populacija sa Balkana u odnosu na populacije 6 zemalja u Evropi (Austrija, Nemačka, Slovačka, Holandija, Francuska i Španija) i jednoj u severnoj Africi (Maroko). Metodologija sekvenciranja opisana je u prethodnom poglavlju.

Za procenu genetičke varijabilnosti vrste *E. maugetii* u Evropi korišćena su dva seta podataka: (1) COI barkodirajući fragment sa ukupno 25 uzoraka (557 bp), uključujući i 7 barkodiranih jedinki ove studije (Slika 8: plavi i crno obojeni krugovi; Tabela 2 u Prilogu 2), i (2) 42 jedinke genotipizirane sa 3' dela COI gena (822 bp) korišćenjem različitih prajmera (Múrria i sar., 2017) (Slika 8: žuti i belo obojeni krugovi; Tabela 3 u Prilogu 2). Korišćene su sve postojeće sekvene vrste koje se nalaze u NCBI GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)) i BOLD bazi nukleotida (<https://www.barcodinglife.com>), a dodatni uzorci (Austrija i Holandija) traženi su na upit.



Slika 8. Mapa analiziranih uzoraka vrste *Elmis maugetii* iz Evrope i severne Afrike (veličina krugova je proporcionalna broju prikupljenih uzoraka). Plavi i žuto obojeni krugovi predstavljaju uzorke iz potencijalnih refugijalnih područja vrste, dok crveni i belo obojeni krugovi predstavljaju područja koja su rekolonizovana nakon poslednjeg glacijalnog maksimuma.

Formirane su dve populacione grupe; jedinke iz Holandije, Francuske, Austrije i Nemačke pripadaju severnoj populacionoj grupi, a jedinke iz Hrvatske, Srbije i Grčke južnoj populacionoj grupi. Za ispitivane populacije vrste *Elmis maugetii* određeni su sledeći populacioni genetički parametri: nukleotidni i diverzitet haplotipova (Nei, 1987),  $\theta$  po mestu iz  $\eta$  - broj polimorfnih mesta na nukleotidu (Tajima, 1996), Tajima's D vrednosti (Tajima, 1989) korišćenjem DnaSP softvera v. 5.10 (Librado i Rozas, 2009) za oba seta podataka. Program TCS v. 1.21. (Clement i sar., 2000) korišćen je za konstruisanje filogenetskih, TCS mreža, metodom statističke parsimonije, na temelju haplotipova COI gena, a posebno za svaki set podataka parcijalnog COI gena. Analizirana je filogeografska struktura različitih populacija vrste *E. maugetii*, kao i potencijalni refugijumi i koridor rekolonizacije vrste na evropskom kontinentu tokom pleistocena.

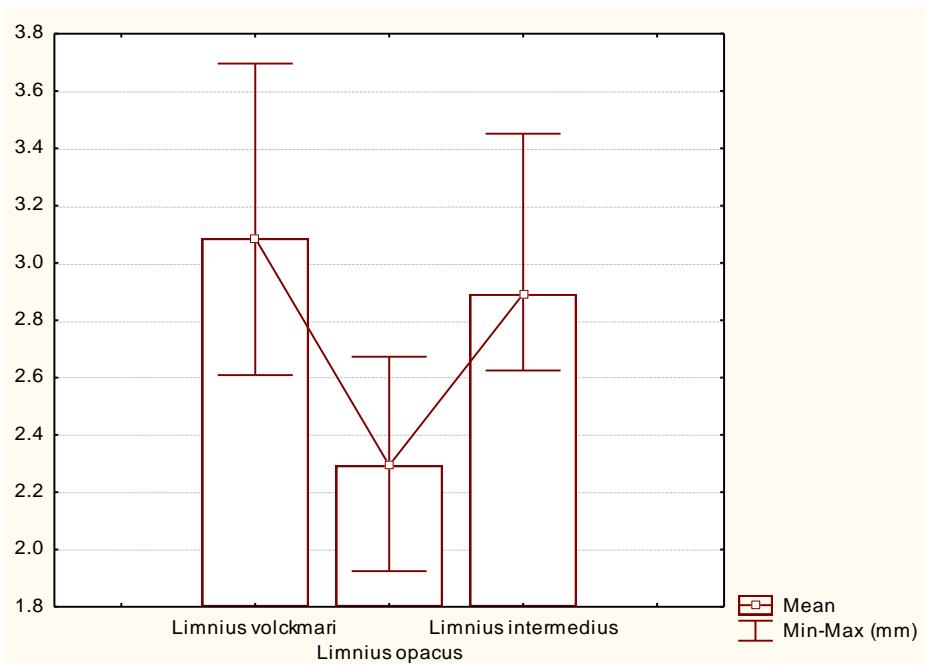
## **4. REZULTATI**

### **4.1. Morfometrijska analiza**

#### **4.1.1. Varijabilnost dužine tela**

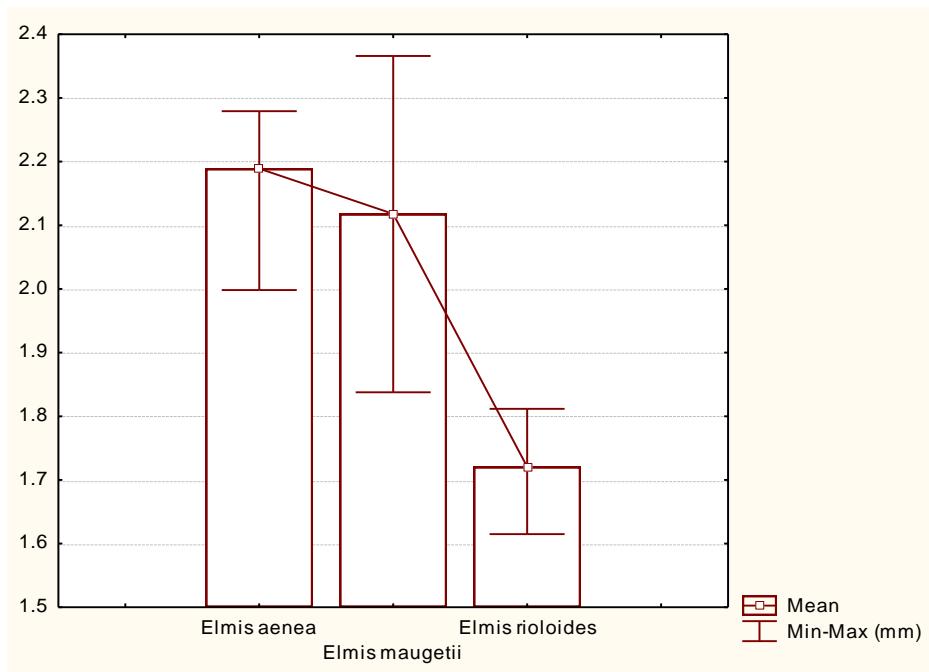
Dimenzije (prosečne dužine tela) izmerenih jedinki odabranih vrsta rodova *Limnius* i *Elmis* su date u milimetrima (mm) u Tabelama 2 i 3 (Prilog 1). U istim tabelama su date i brojnosti prikupljenih jedinki oba roda.

Minimalne, prosečne i maksimalne dužine tela vrsta roda *Limnius* prikazane su na Slici 9. Najkrupnije jedinke vrste *Limnius opacus* uzorkovane su na lokalitetu Pašna Ravan/Trešnjica, Srbija (prosečna dužina tela je 2,585 mm), zatim su sledile jedinke sa lokaliteta Velika Šnjegotina/Šnjegotina, Republika Srpska (prosek 2,25 mm), a najsitnije jedinke su utvrđene na lokalitetu Novi Grad/Sana, Federacija Bosne i Hercegovine (prosek 2,107 mm). Na lokalitetu Velika Šnjegotina/Šnjegotina, Republika Srpska nađene su najkrupnije jedinke vrste *L. intermedius* (prosečna dužina tela 3,208 mm), sledile su jedinke sa lokaliteta Ezeroto/Sivijak, Bugarska (prosek 2,838 mm), a najsitnije jedinke utvrđene su na lokalitetu Bijelila/Una, Federacija Bosne i Hercegovine (prosek 2,697 mm). Najveće izmerene jedinke *L. volckmari* zabeležene su na lokalitetu Pašna Ravan/Trešnjica (prosečna dužina tela 3,569 mm), sledile su jedinke sa sledećih lokaliteta: Plavna/Zamna, Srbija (prosek 3,253 mm), Novi Grad/Sana, Republika Srpska (3,249 mm), Gornja Trešnjica/Trešnjica, Srbija (3,174 mm), reka Kozijata/nizvodno od hidroelektrane „Maluša”, Bugarska (3,092 mm), Gornjak/Mlava, Srbija (3,062 mm), Đakovo/Studenica, Srbija (2,856 mm), a najsitnije izmerene jedinke ove vrste uzorkovane su na lokalitetu Mrtvine/Gaberska Reka, Srbija (prosečna dužina tela 2,725 mm).



Slika 9. Minimalne, prosečne i maksimalne dužine tela vrsta roda *Limnius* na istraživanim lokalitetima

Minimalne, prosečne i maksimalne dužine tela vrsta roda *Elmis* prikazane su na Slici 10. Najkrupnije jedinke vrste *Elmis cf. aenea* uzorkovane su na lokalitetu Gornjak/Mlava, Srbija (prosečna dužina tela 2,242 mm), zatim su sledile jedinke sa sledećih lokaliteta: Novi Grad/Sana, Republika Srpska (prosek 2,194 mm), Bijelila/Una, Federacija Bosne i Hercegovine (2,19 mm), Pašna Ravan/Trešnjica, Srbija (2,184 mm), a najsitnije izmerene jedinke zabeležene su na lokalitetu Đakovo/Studenica, Srbija (prosečna dužina tela 2,124 mm). Na lokalitetu Gornja Trešnijca/Trešnijca, Srbija (prosečna dužina tela 2,235 mm) izmerene su najveće jedinke vrste *Elmis cf. maugetii*, zatim su sledile jedinke sa sledećih lokaliteta: Đakovo/Studenica, Srbija (prosek 2,223 mm), Novi Grad/Sana, Republika Srpska (prosek 2,06 mm), Gornjak/Mlava, Srbija (prosek 2,040 mm), a najsitnije jedinke zabeležene su na lokalitetu Mrtvine/Gaberska Reka, Srbija (prosečna dužina tela 1,938 mm). Najkrupnije jedinke vrste *Elmis cf. rioloides* utvrđene su na lokalitetu Mrtvine/Gaberska Reka, Srbija (prosečna dužina tela 1,767 mm), zatim su sledile jedinke sa lokaliteta Gornjak/Mlava, Srbija (prosek 1,75 mm), a najsitnije jedinke uzorkovane su na lokalitetu Đakovo/Studenica, Srbija (prosečna dužina tela je 1,67 mm).



Slika 10. Minimalne, prosečne i maksimalne dužine tela vrsta roda *Elmis* na istraživanim lokalitetima

Kod svih analiziranih vrsta, dimenzije odgovaraju dimenzijama iz literaturnih izvora (Olmi, 1976; Lompe, 2014; Alonso i d'Alys, 2018), osim kod vrste *L. intermedius* sa lokaliteta Velika Šnjegotina/Šnjegotina, Republika Srpska, gde su zabeležene nešto krupnije jedinke (prosečna dužina tela 3,208 mm).

#### **4.1.2. Analiza glavnih komponenti (PCA)**

Analizom glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*; PCA) obrađeno je 13 morfometrijskih karaktera i 3 morfometrijska indeksa, u vidu morfoloških distanci kod 358 jedinki roda *Limnius* i 333 jedinki roda *Elmis*.

Korišćenjem jednofaktorskog ANOVA i *post-hoc* Tukey HSD testa sa 95%-nim intervalima poverenja, dokazano je da kod svih analiziranih vrsta rodova *Limnius* i *Elmis* postoje statistički značajne razlike (nivo značajnosti  $p \leq 0,05$ ) izmerenih morfometrijskih karaktera [(dužina glave (DG), širina glave (ŠG), rastojanje između očiju (RO), prečnik oka (PO), dužina antena (DA), širina antena (ŠA), dužina pronotuma (DP), širina pronotuma (ŠP), dužina grebena sa strane (DGR), širina polja na pronotumu između grebena (ŠGR), širina od bočne ivice grebena do ivice pronotuma (ŠI), dužina abdomena (DAB) i maksimalna širina abdomena (MŠA)] i izračunatih morfometrijskih indeksa (indeks odnosa dužine i širine glave (OD), odnosa dužine i širine pronotuma (OP) i odnosa dužine i maksimalne širine abdomena (ODŠ)] između populacija sa različitim lokalitetima.

Prva PCA osa je pod velikim uticajem „veličine” (“*general size*” osa, određena veličinom jedinki). S obzirom da veličina može biti značajan taksonomski karakter kod ispitivanih jedinki, i ova „pomoćna” glavna komponenta/osa je razmatrana u daljim analizama. Preostale, tzv. “*shape*” ose opisuju morfološku varijabilnost povezana sa oblicima ispitivanih karaktera i jedinki; ovde su rađene II i III osa. PCA grafikoni prikazani su na Slikama 11-20 za vrste roda *Limnius*, odnosno Slikama 21-30 za vrste roda *Elmis*.

U Tabeli 4 su prikazane *eigen*-vrednosti (boldovano za analizirane ose, I-III) za analizirane vrste i populacije roda *Limnius*. Kao što se vidi u Tabeli 4, prve tri glavne komponente (*eigen*-vektora, ose) opisuju 70,93% ukupne morfološke varijabilnosti. Najveći značaj u diferencijaciji duž druge i treće ose imao je karakter dužina glave (DG), kao i indeks odnosa dužine i širine glave (OD), odnosa dužine i širine pronotuma (OP) i odnosa dužine i maksimalne širine abdomena (ODŠ) (Tabela 5). Značaj pojedinih faktora (boldovano u tabelama opterećenja faktora) prikazan je u Tabeli 5. Kod prve ose, više od deset karaktera je bilo pod velikim uticajem veličine.

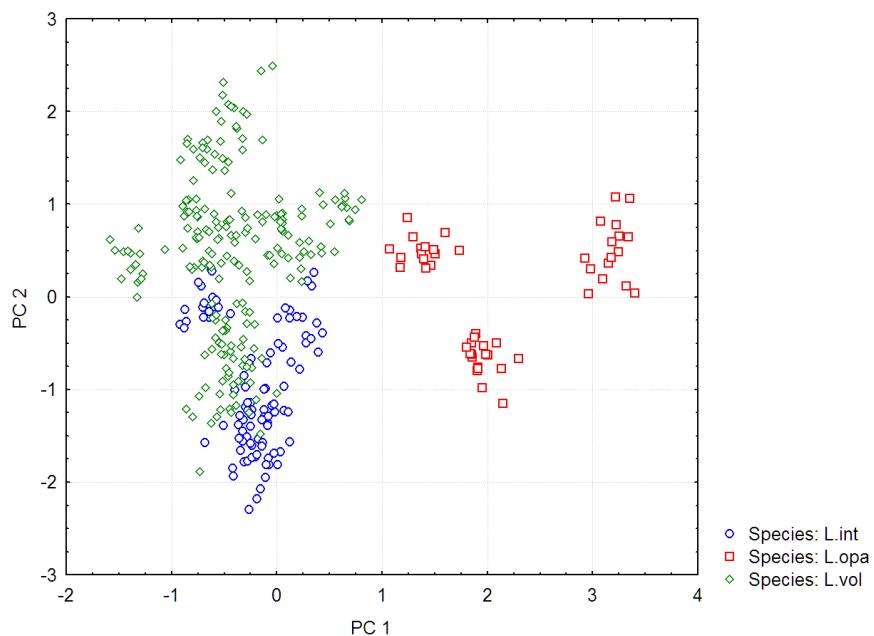
Tabela 4. *Eigen*-vrednosti i kumulativne *eigen*-vrednosti PCA analize morfometrijskih karaktera i indeksa vrsta roda *Limnius*

<i>Eigen</i> -vrednosti korelacionog matriksa i povezane statistike				
	<i>Eigen</i> -vrednost	% ukupne varijanse	Kumulativna <i>eigen</i> -vrednost	Kumulativna - %
<b>1</b>	<b>8,162020</b>	<b>48,01188</b>	<b>8,16202</b>	<b>48,0119</b>
<b>2</b>	<b>2,375963</b>	<b>13,97625</b>	<b>10,53798</b>	<b>61,9881</b>
<b>3</b>	<b>1,520180</b>	<b>8,94223</b>	<b>12,05816</b>	<b>70,9304</b>
<b>4</b>	1,106588	6,50934	13,16475	77,4397
<b>5</b>	0,981021	5,77071	14,14577	83,2104
<b>6</b>	0,774551	4,55618	14,92032	87,7666
<b>7</b>	0,575405	3,38474	15,49573	91,1513
<b>8</b>	0,465974	2,74102	15,96170	93,8924
<b>9</b>	0,270222	1,58954	16,23192	95,4819
<b>10</b>	0,242919	1,42893	16,47484	96,9108
<b>11</b>	0,188484	1,10873	16,66332	98,0196
<b>12</b>	0,135770	0,79865	16,79909	98,8182
<b>13</b>	0,106173	0,62455	16,90527	99,4427
<b>14</b>	0,081836	0,48139	16,98710	99,9241
<b>15</b>	0,008290	0,04876	16,99539	99,9729
<b>16</b>	0,002990	0,01759	16,99838	99,9905
<b>17</b>	0,001617	0,00951	17,00000	100,0000

Tabela 5. Prva tri faktora razdvajanja morfometrijskih karaktera i indeksa vrsta roda *Limnius*

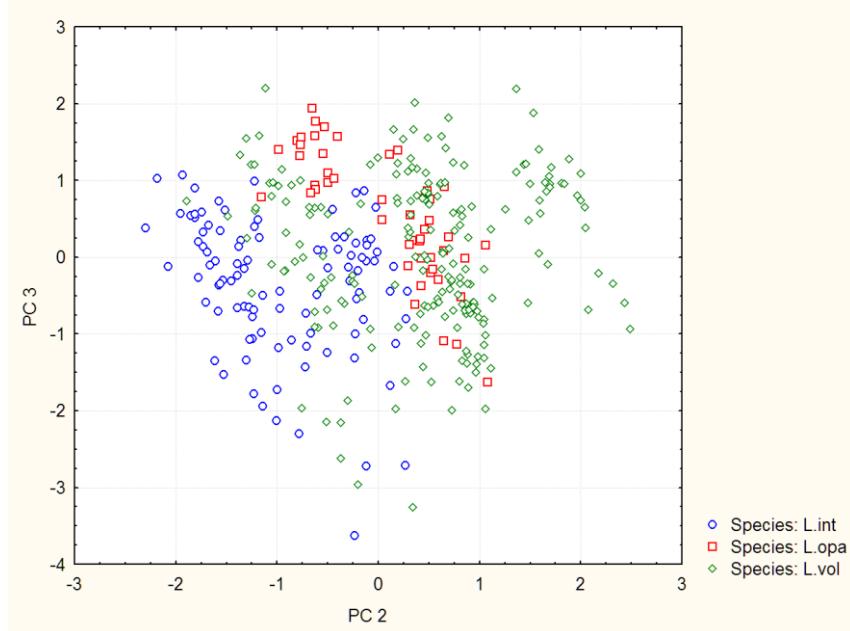
Faktor-promenljive korelacije (opterećenja faktora)			
	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3
<b>DG</b>	-0,508530	<b>0,781336</b>	0,250583
<b>ŠG</b>	-0,851120	-0,317841	0,006409
<b>OD</b>	-0,204199	<b>0,918238</b>	0,237082
<b>RO</b>	-0,891341	-0,101783	-0,180225
<b>PO</b>	-0,862833	0,053929	-0,028744
<b>DA</b>	-0,620803	-0,401700	-0,056712
<b>ŠA</b>	-0,897451	0,182119	-0,045697
<b>DP</b>	-0,858941	-0,214454	-0,303216
<b>ŠP</b>	-0,764772	-0,292812	0,251025
<b>OP</b>	-0,285990	0,083559	<b>-0,698725</b>
<b>DGR</b>	-0,647763	0,231913	0,038275
<b>ŠGR</b>	-0,528699	0,244382	0,127322
<b>ŠI</b>	-0,248897	-0,127676	-0,051937
<b>DAB</b>	-0,957818	-0,063032	0,000031
<b>MŠA</b>	-0,679291	-0,390601	0,486559
<b>ODŠ</b>	-0,221523	0,376679	<b>-0,672856</b>
<b>UD</b>	-0,902271	0,215747	0,097520

Uzveši u obzir analizirane vrste roda *Limnius*, u prostoru prve dve glavne ose uočava se izdvajanje vrste *L. opacus* od preostale dve vrste duž prve ose, što se može objasniti uticajem veličine. U odnosu na drugu osu, razdvajanje vrsta je bilo slabije izraženo, pri čemu se može uočiti razlika između vrsta *L. volckmari* i *L. intermedius* (Slika 11).



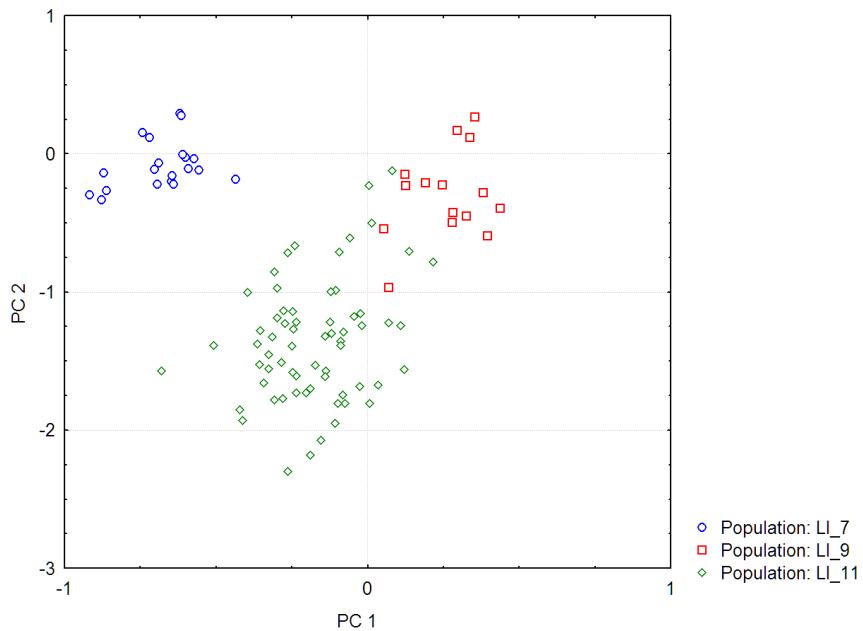
Slika 11. Varijabilnost morfometrijskih karaktera i indeksa vrsta roda *Limnius*; prva i druga osa. Skraćenice: L.int - *L. intermedius*, L.opa - *L. opacus*, L. vol - *L. volckmari*

Varijabilnost u prostoru druge i treće PC ose (uticaj oblika) kod svih vrsta roda *Limnius* okarakterisana je preklapanjem svih vrsta po obe ose (Slika 12).



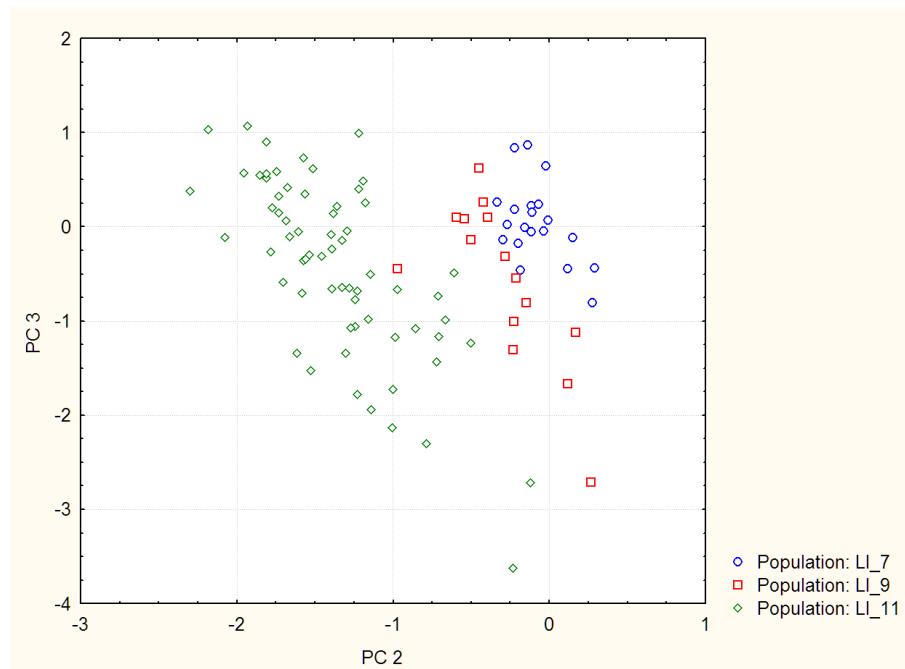
Slika 12. Varijabilnost morfometrijskih karaktera i indeksa vrsta roda *Limnius*; druga i treća osa. Skraćenice: L.int - *L. intermedius*, L.opa - *L. opacus*, L. vol - *L. volckmari*

Kod vrste *Limnius intermedius*, u odnosu na prvu osu, jedinke populacije sa lokaliteta Velika Šnjegotina/Šnjegotina izdvajile su se u odnosu na jedinke populacija sa lokaliteta Bijelina/Una i Ezeroto/Sivjak, koje se delimično preklapaju, dok u odnosu na drugu osu dolazi do preklapanja jedinki sve tri populacije (Slika 13).



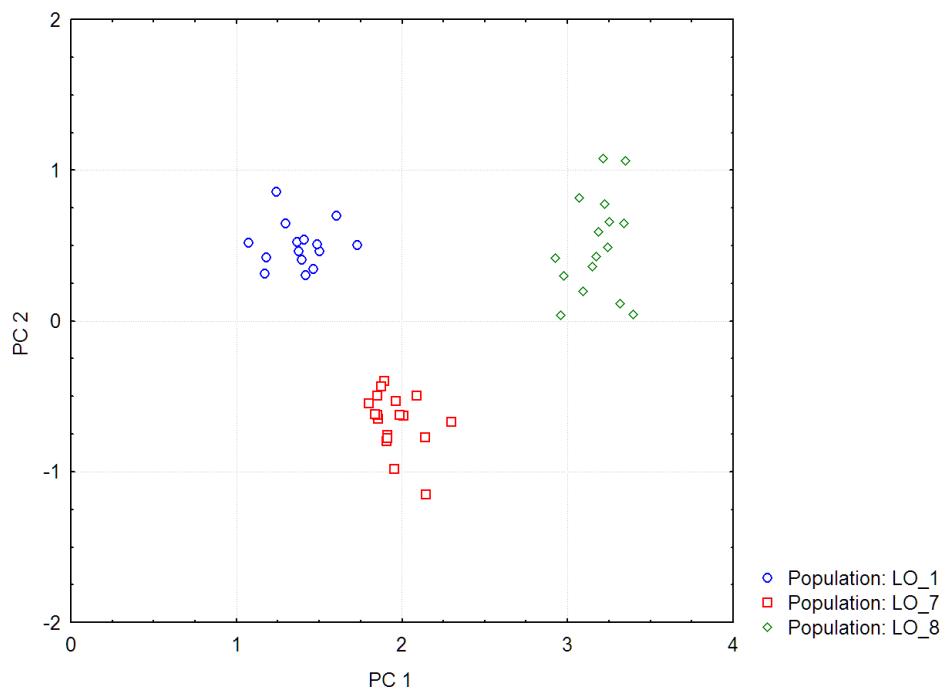
Slika 13. Morfometrijska varijabilnost populacija vrste *Limnius intermedius*; prva i druga osa

Kod vrste *Limnius intermedius*, jedinke populacija sa sva tri lokaliteta (Velika Šnjegotina/Šnjegotina, Bijelina/Una i Ezeroto/Sivjak) su se preklopile po drugoj i trećoj PC osi (Slika 14).



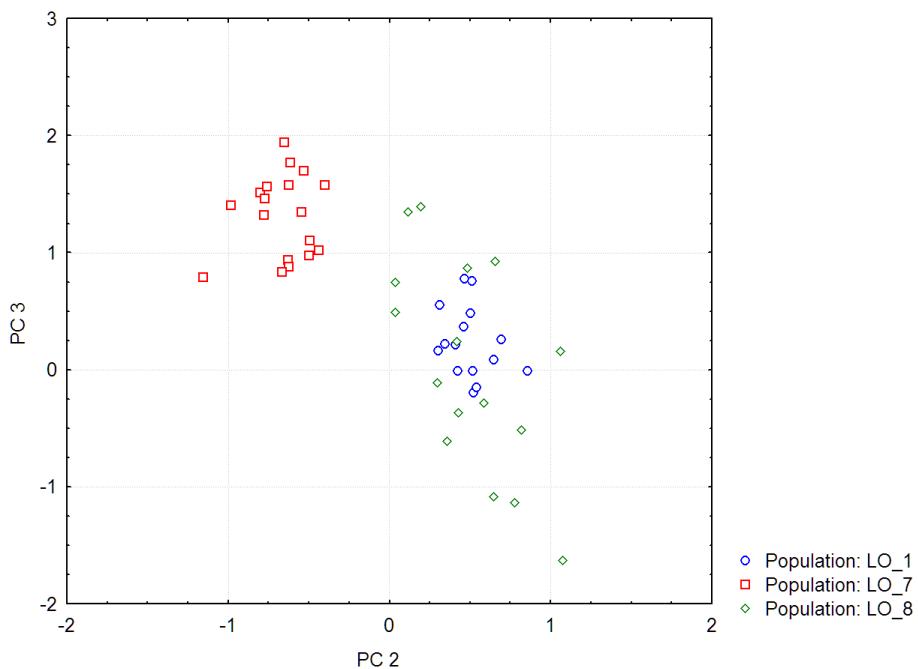
Slika 14. Morfometrijska varijabilnost populacija vrste *Limnius intermedius*; druga i treća osa (brojevi lokaliteta uz vrstu dati su kao u Tabeli 1)

Kod vrste *Limnius opacus* jedinke populacije sa sva tri lokaliteta (Pašna Ravan/Trešnjica, Bijelina/Una i Novi Grad/Sana) jasno su izdvojene u pozitivnom delu prve PC ose. U odnosu na drugu PCA osu, populacije Pašna Ravan/Trešnjica i Novi Grad/Sana nalaze se u pozitivnom, a populacije Velika Šnjegotina/Šnjegotina u negativnom delu ose (Slika 15).



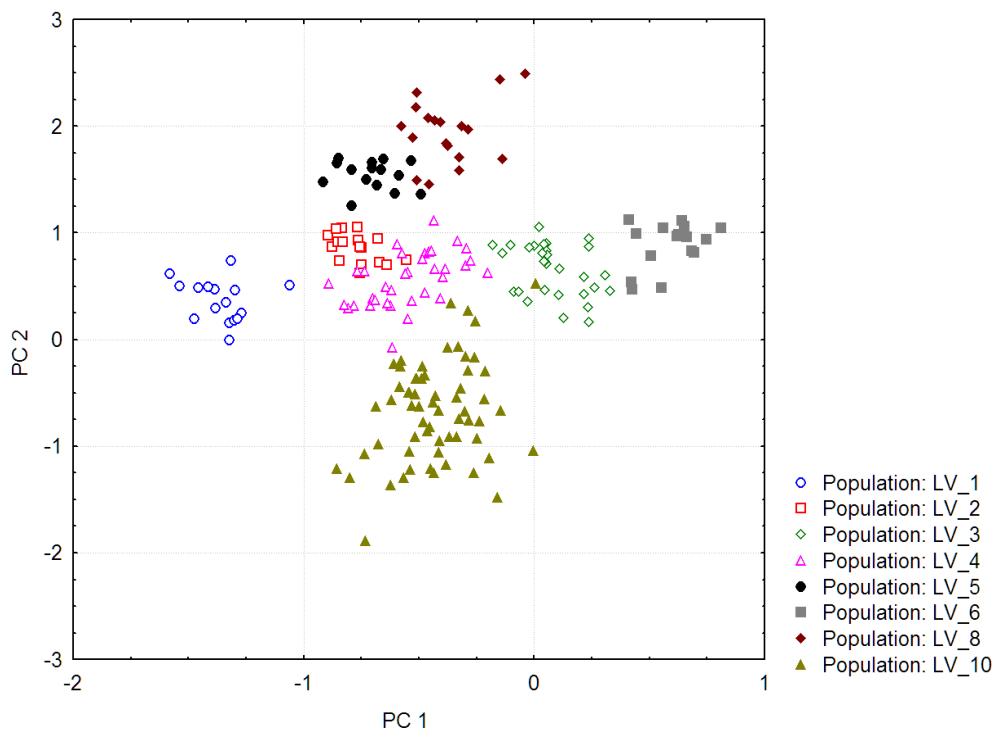
Slika 15. Morfometrijska varijabilnost populacija vrste *Limnius opacus*; prva i druga osa (brojevi lokaliteta uz vrstu dati su kao u Tabeli 1)

Kod vrste *Limnius opacus*, u odnosu na drugu osu, populacija Velika Šnjegotina/Šnjegotina se izdvojila u negativnom delu ose, dok su se populacije sa lokaliteta Pašna Ravan/Trešnjica i Novi Grad/Sana preklopile u pozitivnom delu druge ose. U odnosu na treću osu, populacije vrste *L. opacus* sa sva tri lokaliteta su se preklopile (Slika 16).



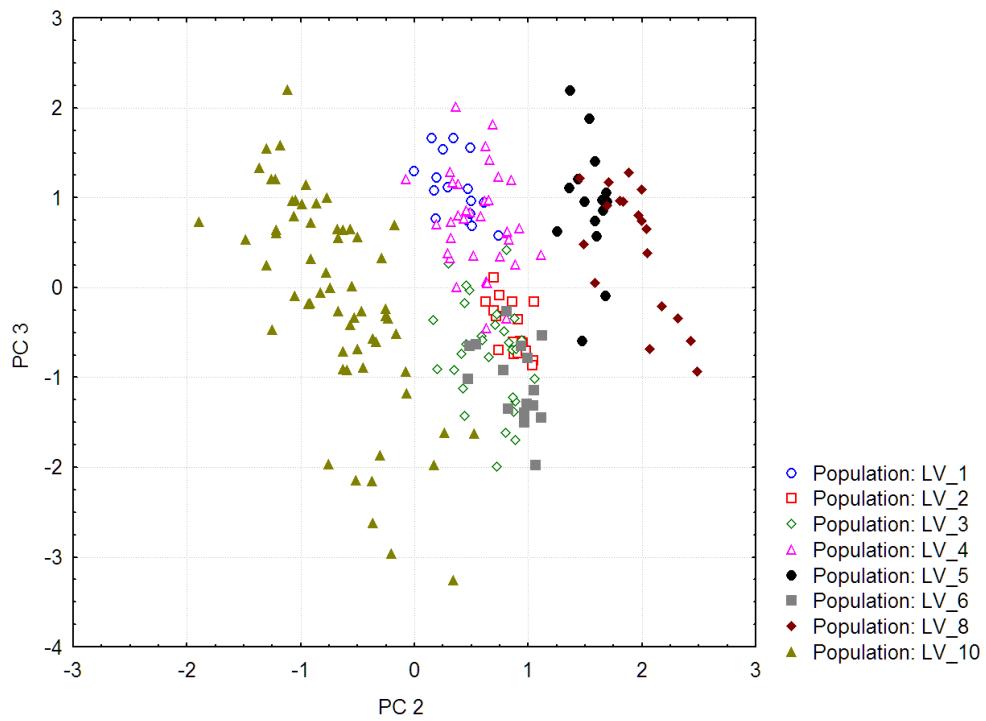
Slika 16. Morfometrijska varijabilnost populacija vrste *Limnius opacus*; druga i treća osa (brojevi lokaliteta uz vrstu dati su kao u Tabeli 1)

Kod vrste *Limnius volckmari*, u odnosu na prvu osu, jedinke populacija sa lokaliteta Pašna Ravan/Trešnjica i Mrtvine/Gaberska Reka su jasno izdvojene, dok se jedinke svih ostalih populacija (Gornja Trešnjica/Trešnjica, Đakovo/Studenica, Gornjak/Mlava, Plavna/Zamna, Novi Grad/Sana i Kozijata/nizvodno od Maluše) su se delimično preklopile. U odnosu na drugu osu, populacije Plavna/Zamna i Novi Grad/Sana su se neznatno izdvojile i preklopile u pozitivnom delu ose, dok su se populacije sa svih ostalih lokaliteta (Pašna Ravan/Trešnjica, Gornja Trešnjica/Trešnjica, Đakovo/Studenica, Gornjak/Mlava, Mrtvine/Gaberska Reka i Kozijata/nizvodno od Maluše) preklopile po drugoj osi (Slika 17).



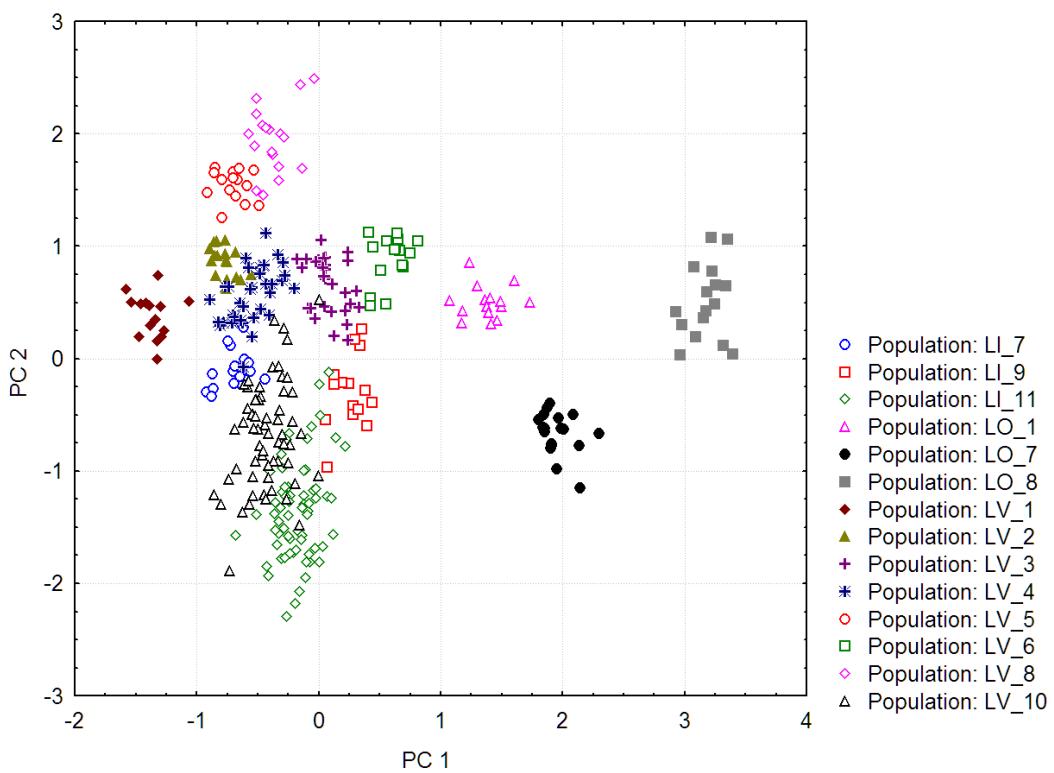
Slika 17. Morfometrijska varijabilnost populacija vrste *Limnius volckmari*; prva i druga osa (brojevi lokaliteta uz vrstu dati su kao Tabeli 1)

Kod vrste *Limnius volckmari*, u odnosu na drugu i treću osu, populacije sa lokaliteta Plavna/Zamna i Novi Grad/Sana su izdvojene u pozitivnom delu druge ose, dok su se u odnosu na treću osu, sve analizirane populacije vrste preklopile (Slika 18).



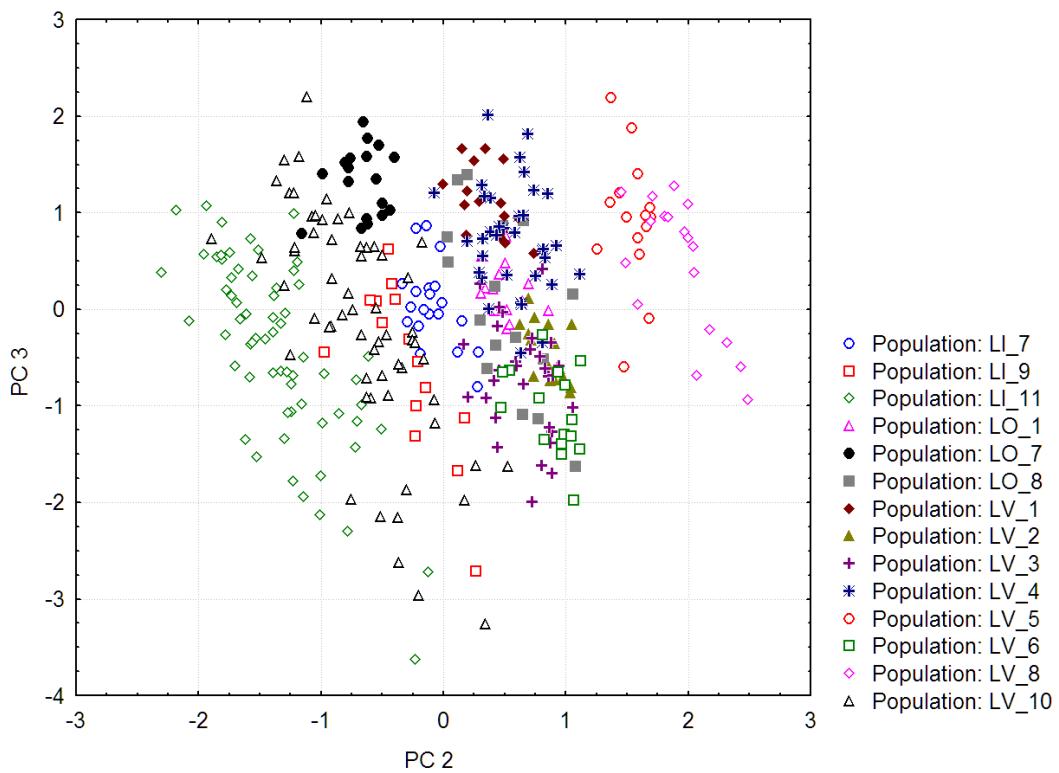
Slika 18. Morfometrijska varijabilnost populacija vrste *Limnius volckmari*; druga i treća osa (brojevi lokaliteta uz vrstu dati su kao u Tabeli 1)

Uzveši u obzir sve populacije vrste roda *Limnius*, u odnosu na prvu osu, populacije vrste *L. volckmari* sa lokaliteta Pašna Ravan/Trešnjica su izdvojene u negativnom delu ose, dok su se jedinke populacija vrste *L. opacus* sa lokaliteta Pašna Ravan/Trešnjica i Velika Šnjegotina/Šnjegotina neznatno preklopile. Sve ostale populacije svih vrsta roda *Limnius* se preklapaju po prvoj osi. U odnosu na drugu PC osu, sve analizirane populacije svih vrsta roda *Limnius* su se preklopile (Slika 19).



Slika 19. Morfometrijska varijabilnost populacija svih vrsta roda *Limnius*; prva i druga osa. Skraćenice: LI - *L. intermedius*, LO - *L. opacus*, LV - *L. volckmari* (brojevi lokaliteta uz vrste dati su kao u Tabeli 1)

Uzveši u obzir populacije svih vrsta roda *Limnius*, u odnosu na drugu i treću PC osu (uticaj oblika), u prostoru druge ose, neznatno su se izdvojile i preklopile populacije vrste *L. volckmari* sa lokaliteta Plavna/Zamna i Novi Grad/Sana. Sve ostale populacije vrsta su se preklopile po drugoj osi, dok je po trećoj osi došlo do preklapanja svih populacija svih vrsta roda *Limnius* (Slika 20).



Slika 20. Morfometrijska varijabilnost populacija svih vrsta roda *Limnius*; druga i treća osa. Skraćenice: LI - *L. intermedius*, LO - *L. opacus*, LV - *L. volckmari* (brojevi lokaliteta uz vrste dati su kao u Tabeli 1)

U Tabeli 6 su izdvojene *eigen*-vrednosti (boldovano za analizirane ose, I-III) za analizirane vrste roda *Elmis*. Kao što se vidi u Tabeli 6, prve tri glavne komponente (*eigen*-vektora, ose) opisuju 44,53% ukupne morfološke varijabilnosti. Značaj pojedinih faktora (boldovano u tabelama opterećenja faktora) prikazan je u Tabeli 7. Najveći značaj u diferencijaciji duž druge i treće ose imaju karakteri širina antena (ŠA), širina pronotuma (ŠP) i maksimalna širina abdomena (MŠA), kao i indeks odnosa dužine i širine pronotuma (OP) i indeks odnosa dužine i maksimalne širine abdomena (ODŠ).

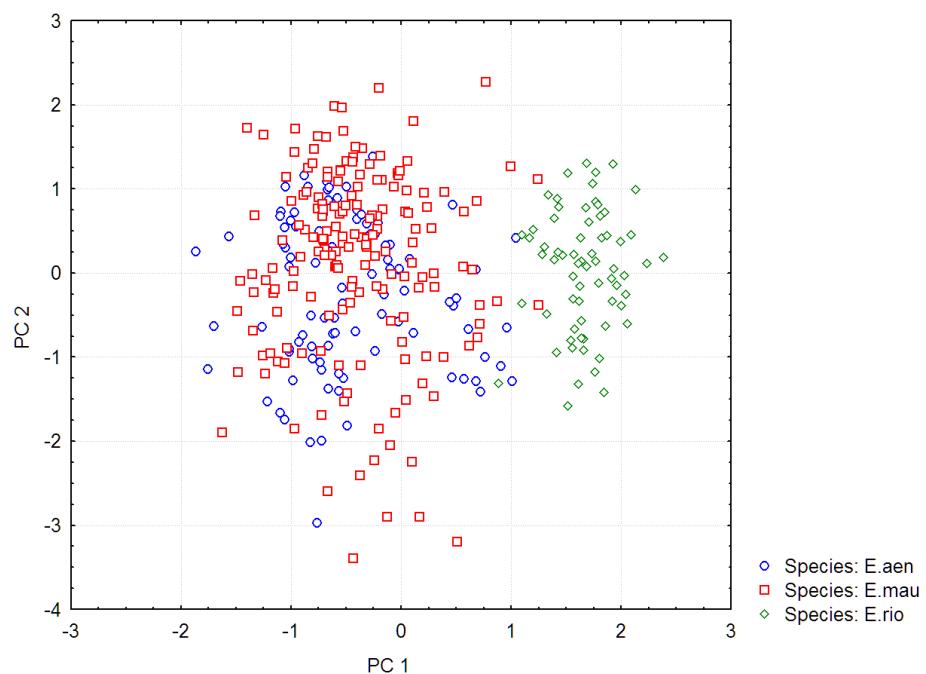
Tabela 6. *Eigen*-vrednosti i kumulativne *eigen*-vrednosti PCA analize morfometrijskih karaktera i indeksa vrsta roda *Elmis*

<i>Eigen</i> -vrednosti korelacionog matriksa i povezane statistike				
	<i>Eigen</i> -vrednost	% ukupne varijanse	Kumulativna <i>eigen</i> -vrednost	Kumulativna - %
<b>1</b>	<b>3,129133</b>	<b>18,40666</b>	<b>3,12913</b>	<b>18,4067</b>
<b>2</b>	<b>2,616756</b>	<b>15,39268</b>	<b>5,74589</b>	<b>33,7993</b>
<b>3</b>	<b>1,824823</b>	<b>10,73425</b>	<b>7,57071</b>	<b>44,5336</b>
<b>4</b>	1,374372	8,08454	8,94508	52,6181
<b>5</b>	1,266088	7,44758	10,21117	60,0657
<b>6</b>	1,120883	6,59343	11,33206	66,6591
<b>7</b>	1,019828	5,99899	12,35188	72,6581
<b>8</b>	0,971603	5,71531	13,32349	78,3734
<b>9</b>	0,808529	4,75605	14,13202	83,1295
<b>10</b>	0,750783	4,41637	14,88280	87,5459
<b>11</b>	0,694655	4,08620	15,57745	91,6321
<b>12</b>	0,602953	3,54678	16,18041	95,1789
<b>13</b>	0,484104	2,84767	16,66451	98,0265
<b>14</b>	0,289816	1,70480	16,95433	99,7313
<b>15</b>	0,025123	0,14778	16,97945	99,8791
<b>16</b>	0,014444	0,08497	16,99389	99,9641
<b>17</b>	0,006107	0,03592	17,00000	100,0000

Tabela 7. Prva tri faktora razdvajanja morfometrijskih karaktera i indeksa vrsta roda *Elmis*

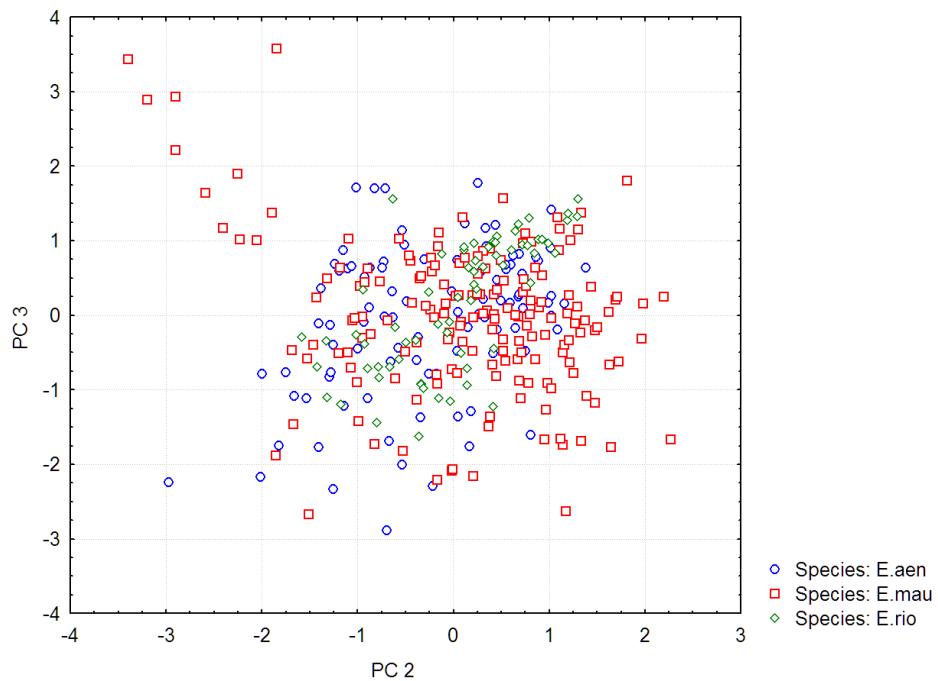
Faktor-promenljive korelacije (opterećenja faktora)			
	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3
<b>DG</b>	-0,872644	0,066390	0,224291
<b>ŠG</b>	0,071353	0,231032	-0,216369
<b>OD</b>	-0,847717	-0,071199	0,308266
<b>RO</b>	0,040343	0,003111	0,003942
<b>PO</b>	-0,135026	0,142316	0,299741
<b>DA</b>	-0,125531	0,423767	0,372557
<b>ŠA</b>	0,086019	<b>0,703752</b>	-0,042030
<b>DP</b>	0,269550	0,122366	<b>0,718789</b>
<b>ŠP</b>	-0,214948	<b>0,710678</b>	-0,292287
<b>OP</b>	0,313789	-0,489314	<b>0,730223</b>
<b>DGR</b>	0,024008	0,164087	0,263283
<b>ŠGR</b>	0,158075	-0,322919	0,156996
<b>ŠI</b>	-0,067891	0,027617	0,171117
<b>DAB</b>	-0,664217	-0,207634	-0,015199
<b>MŠA</b>	-0,066888	<b>0,663429</b>	0,281226
<b>ODŠ</b>	-0,402991	<b>-0,692589</b>	-0,250575
<b>UD</b>	-0,863329	0,066607	0,039745

Posmatrajući sve vrste roda *Elmis* u odnosu na prvu PC osu, vrsta *Elmis cf. rioloides* je neznatno izdvojena u pozitivnom delu prve ose, i došlo je do delimičnog preklapanja ove vrste sa vrstom *E. cf. maugetii*, a neznatno i sa vrstom *E. cf. aenea*. U odnosu na drugu osu, sve tri vrste roda *Elmis* su se preklopile (Slika 21).



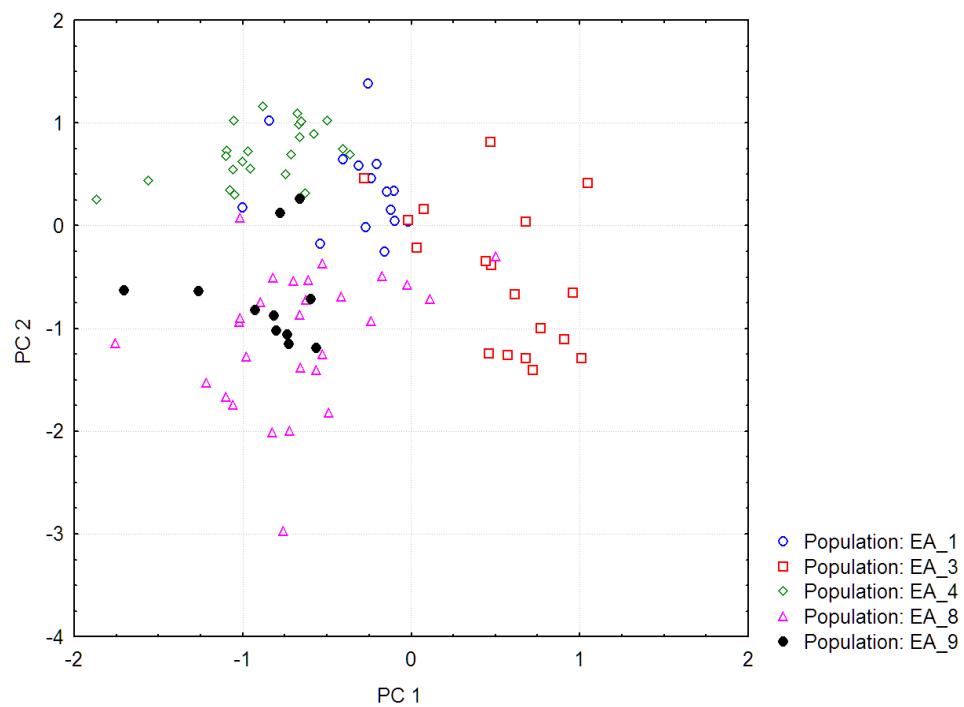
Slika 21. Varijabilnost morfometrijskih karaktera i indeksa vrsta roda *Elmis*; prva i druga osa. Skraćenice: E.aen - *E. cf. aenea*, E.mau - *E. cf. maugetii*, E.rio - *E. cf. rioloides*

Varijabilnost u prostoru druge i treće PCA ose (uticaj oblika) kod svih vrsta roda *Elmis*, kao i kod vrsta roda *Limnius*, okarakterisana je preklapanjem svih vrsta po obe ose (Slika 22).



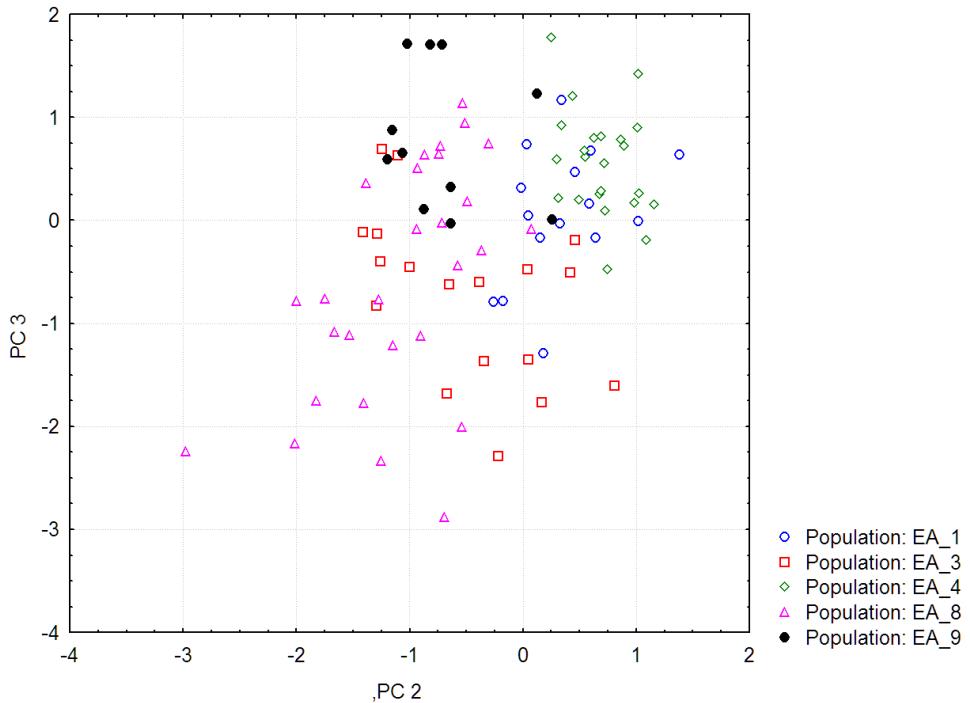
Slika 22. Varijabilnost morfometrijskih karaktera i indeksa vrsta roda *Elmis*; druga i treća osa. Skraćenice: E. aen - *E. cf. aenea*, E. mau - *E. cf. maugetii*, E. rio - *E. cf. rioloides*

Kod vrste *Elmis cf. aenea*, u odnosu na prvu osu, jedinke populacije sa lokaliteta Đakovo/Studenica neznatno su izdvojene u pozitivnom delu ose, a malim delom i u negativnom, i delimično su se preklapile sa populacijom sa lokaliteta Novi Grad/Sana. Populacija *E. cf. aenea* sa Novi Grad/Sana se neznatno preklopila sa populacijom Pašna Ravan/Trešnjica. U odnosu na drugu osu, došlo je do preklapanja jedinki svih analiziranih populacija: Pašna Ravan/Trešnjica, Đakovo/Studenica, Gornjak/Mlava, Novi Grad/Sana i Bijelila/Una (Slika 23).



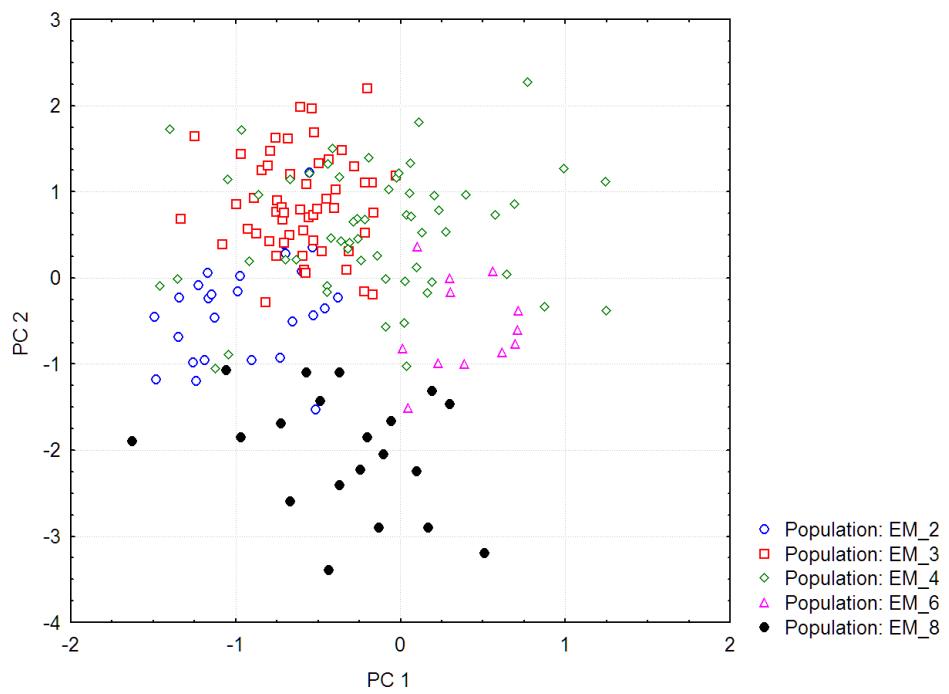
Slika 23. Morfometrijska varijabilnost populacija vrste *Elmis cf. aenea*; prva i druga osa (brojevi lokaliteta uz vrstu dati su kao u Tabeli 1)

Kod vrste *Elmis cf. aenea*, po drugoj i trećoj osi, jedinke populacija sa svih lokaliteta su se preklopile (Slika 24).



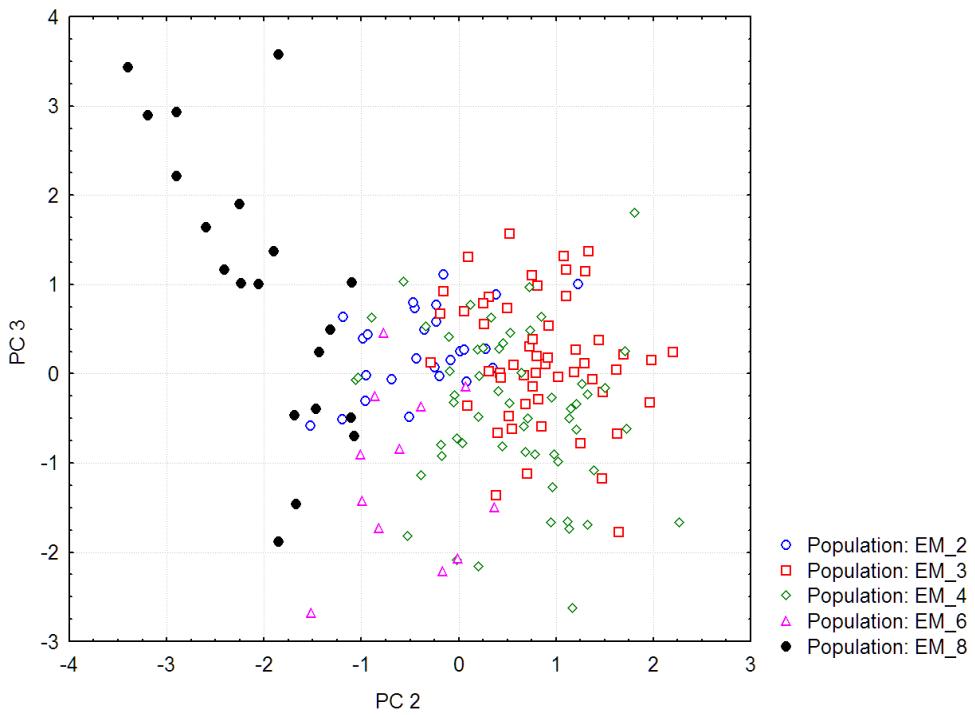
Slika 24. Morfometrijska varijabilnost populacija vrste *Elmis cf. aenea*; druga i treća osa (brojevi lokaliteta uz vrstu dati su kao u Tabeli 1)

Kod vrste *Elmis cf. maugetii*, jedinke svih populacija (Gornja Trešnjica/Trešnjica, Đakovo/Studenica, Gornjak/Mlava, Mrtvine/Gaberska Reka i Novi Grad/Sana) su se preklopile i po prvoj i po drugoj PC osi (Slika 25).



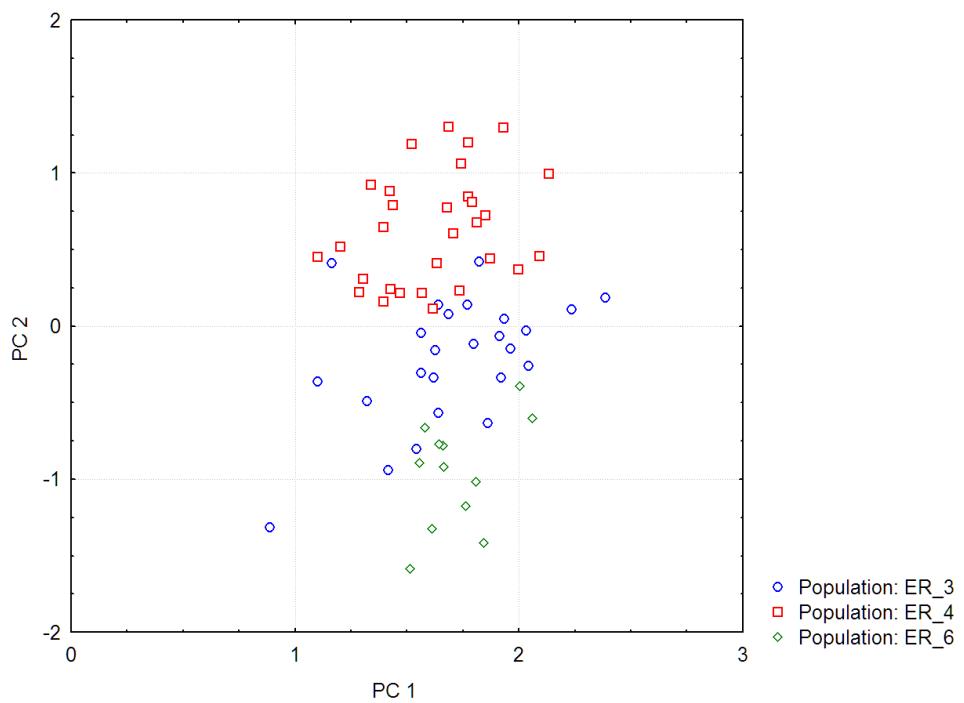
Slika 25. Morfometrijska varijabilnost populacija vrste *Elmis cf. maugetii*; prva i druga osa (brojevi lokaliteta uz vrstu dati su kao u Tabeli 1)

Kod vrste *Elmis cf. maugetii*, u odnosu na drugu PC osu, populacija sa lokaliteta Novi Grad/Sana se izdvojila u negativnom delu ose, i neznatno se preklopila sa populacijama sa lokaliteta Gornja Trešnjica/Trešnjica, Gornjak/Mlava i Mrtvine/Gaberska Reka. U odnosu na treću osu, došlo je do preklapanja svih populacija vrste (Slika 26).



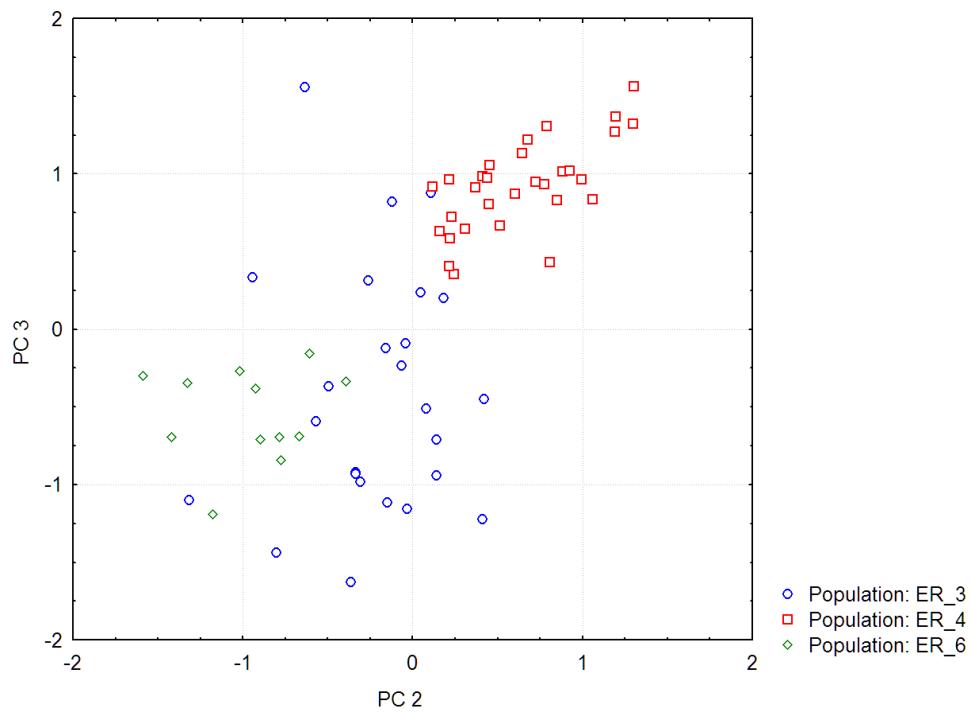
Slika 26. Morfometrijska varijabilnost populacija vrste *Elmis cf. maugetii*; druga i treća osa (brojevi lokaliteta uz vrstu dati su kao u Tabeli 1)

Kod vrste *Elmis cf. rioloides*, u prostoru prve PC ose, sve populacije (Đakovo/Studenica, Gornjak/Mlava i Mrtvine/Gaberska Reka) su se preklopile. U prostoru druge ose, populacija sa lokaliteta Mrtvine/Gaberska Reka se izdvojila u negativnom delu ose, i delimično preklopila sa populacijom Đakovo/Studenica, koja prelazi i u pozitivan deo druge ose. Populacije Đakovo/Studenica i Gornjak/Mlava su se preklopile u pozitivnom delu druge PC ose (Slika 27).



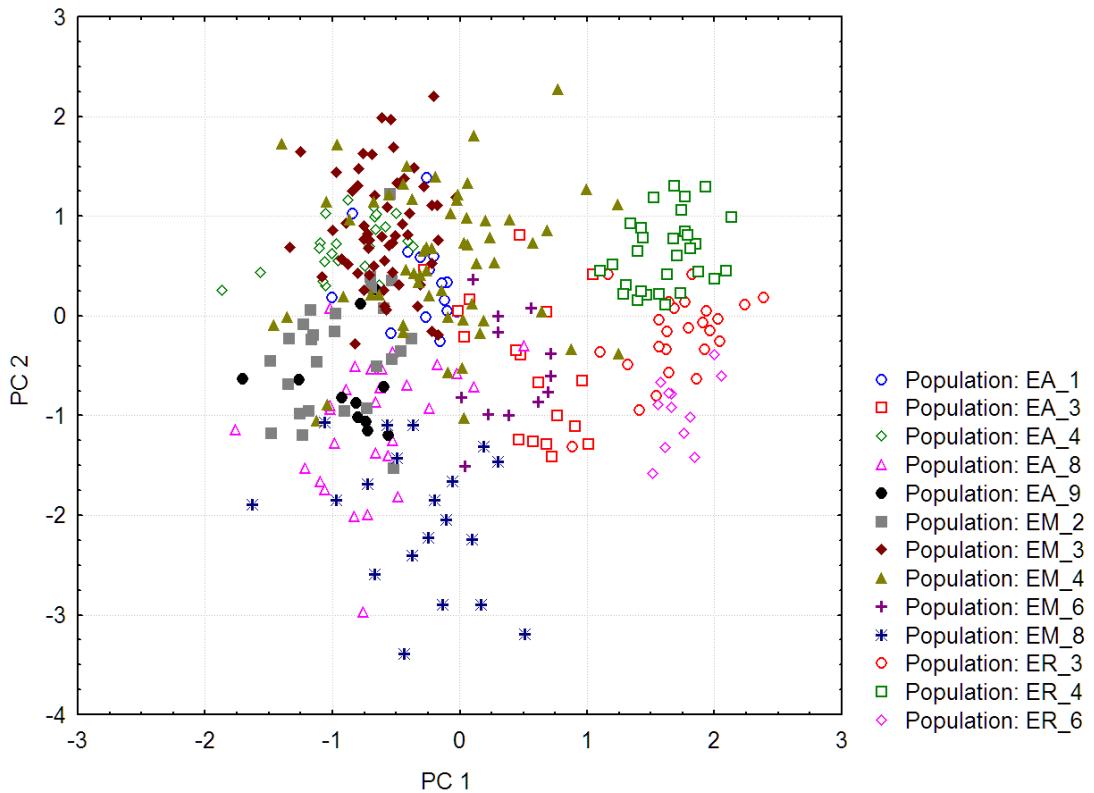
Slika 27. Morfometrijska varijabilnost populacija vrsta *Elmis cf. rioloides*; prva i druga osa (brojevi lokaliteta uz vrstu dati su kao u Tabeli 1)

Kod vrste *Elmis cf. rioloides*, u odnosu na drugu PC osu, jedinke populacije sa lokaliteta Gornjak/Mlava su se izdvojile u pozitivnom delu ose, i neznatno preklopile sa jedinkama populacije sa lokaliteta Đakovo/Studenica. Jedinke populacije Mrtvine/Gaberska Reka, koje su u negativnom delu druge PC ose, delimično su se preklopile sa jedinkama populacije Đakovo/Studenica, koje su i u pozitivnom i u negativnom delu ose. U odnosu na treću PC osu, preklapanje svih jedinki populacija vrste (Đakovo/Studenica, Gornjak/Mlava i Mrtvine/Gaberska Reka) je isto kao i u odnosu na drugu PC osu (Slika 28).



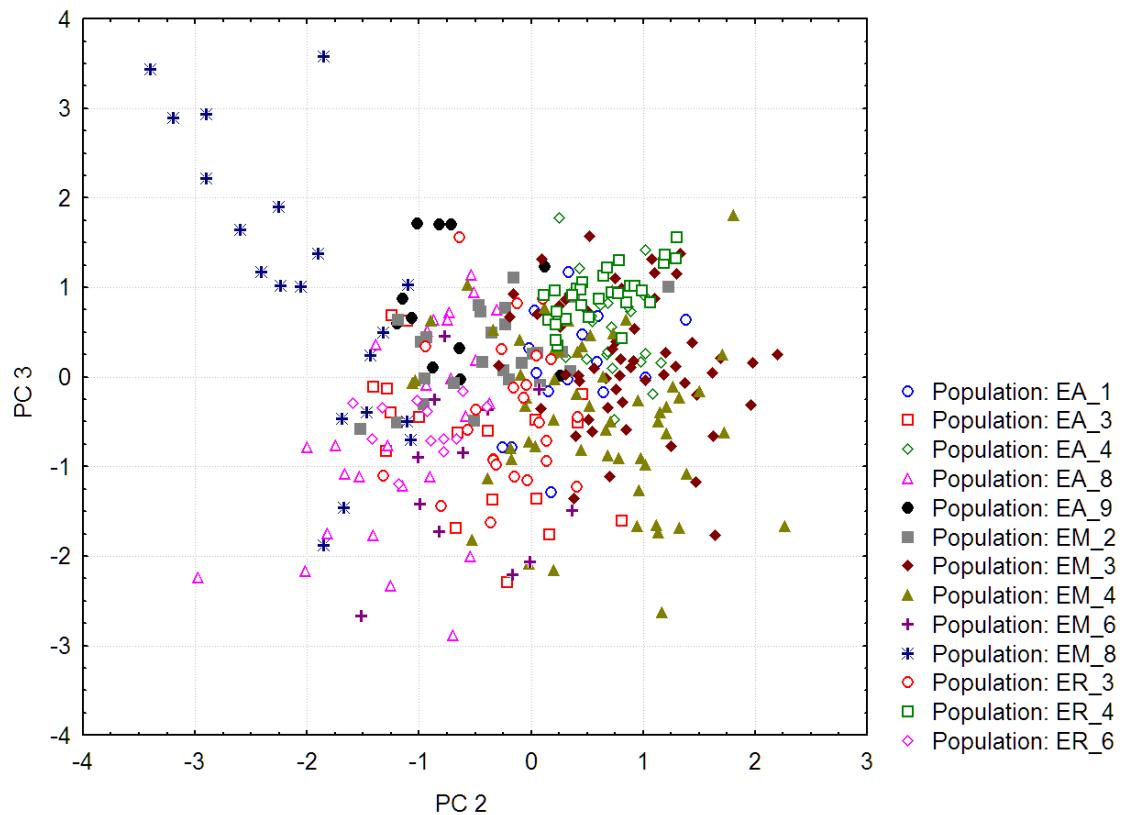
Slika 28. Morfometrijska varijabilnost populacija vrste *Elmis cf. rioloides*; druga i treća osa (brojevi lokaliteta uz vrstu dati su kao u Tabeli 1)

Uzevši u obzir sve populacije vrste roda *Elmis*, u odnosu na prvu PC osu, u pozitivnom delu prve PC ose, preklopile su se jedinke populacije vrste *E. cf. aenea* sa lokaliteta Đakovo/Studenica, jedinke populacija vrste *E. cf. rioloides* sa lokaliteta Đakovo/Studenica i Mrtvine/Gaberska Reka, a neznatno i jedinke populacija vrste *E. cf. maugetii* sa lokaliteta Gornjak/Mlava, Mrtvine/Gaberska Reka i Novi Grad/Sana. U negativnom delu prve PC ose, došlo je do preklapanja svih analiziranih populacija vrsta *E. cf. maugetii* i *E. cf. aenea*, osim vrste *E. cf. rioloides*, čije su sve populacije (Đakovo/Studenica, Gornjak/Mlava i Mrtvine/Gaberska Reka), u pozitivnom delu prve PC ose. U odnosu na drugu PC osu, sve populacije svih vrsta roda *Elmis* su se preklopile (Slika 29).



Slika 29. Morfometrijska varijabilnost populacija svih vrsta roda *Elmis*; prva i druga osa. Skraćenice: EA - *E. cf. aenea*, EM - *E. cf. maugetii*, ER - *E. cf. rioloides* (brojevi lokaliteta uz vrste dati su kao u Tabeli 1)

Uzveši u obzir populacije svih vrsta roda *Elmis*, u odnosu na drugu i treću osu (uticaj oblika), u prostoru druge PC ose se izdvojila populacija vrste *E. cf. maugetii* sa lokaliteta Novi Grad/Sana u negativnom delu ose, i preklopila sa svim ostalim populacijama vrsta, osim sa populacijama vrste *E. cf. maugetii* sa lokaliteta Đakovo/Studenica i Mrtvine/Gaberska Reka, i populacijom vrste *E. cf. aenea* sa lokaliteta Gornjak/Mlava. Po trećoj osi, sve populacije svih vrsta roda *Elmis* su se preklopile (Slika 30).



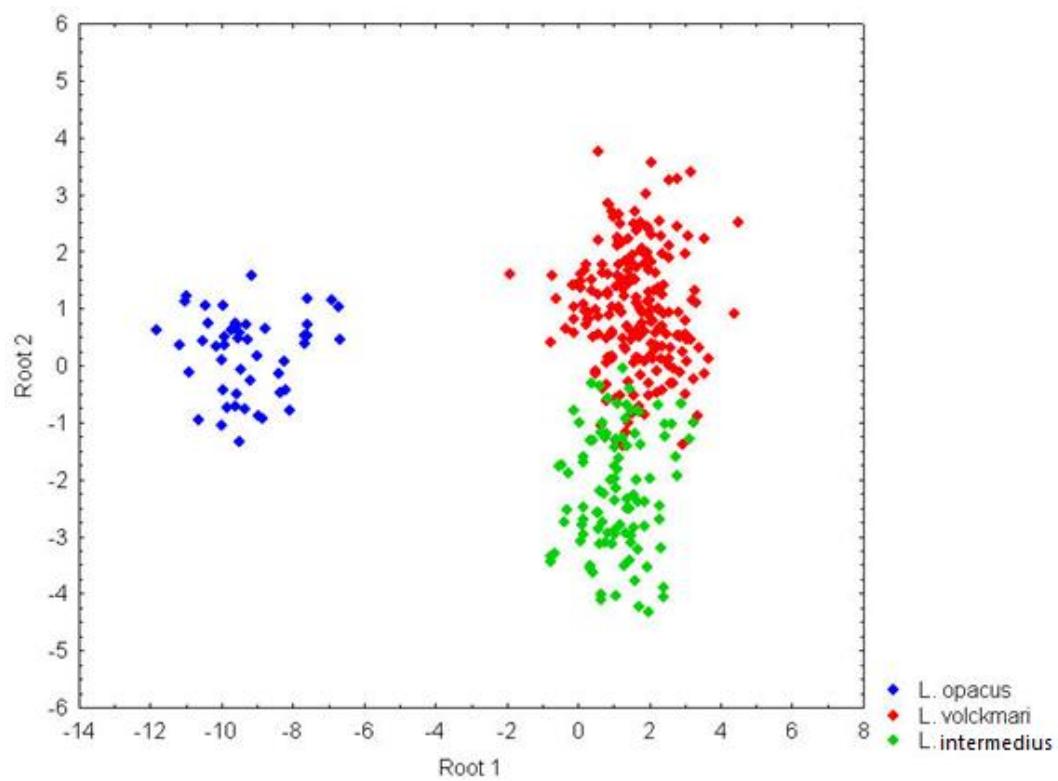
Slika 30. Morfometrijska varijabilnost populacija svih vrsta roda *Elmis*; druga i treća osa. Skraćenice: EA - *E. cf. aenea*, EM - *E. cf. maugetii*, ER - *E. cf. rioloides* (brojevi lokaliteta uz vrste dati su kao u Tabeli 1)

#### 4.1.3. Diskriminantna analiza (DA)

Primenom diskriminantne analize ustanovljeno je da kod vrsta roda *Limnius* morfometrijski karakter širina abdomena (ŠA) najviše doprinosi razdvajaju između vrsta i nosi najveći deo varijabilnosti: ukupno 87% po prvoj osi (Tabela 8). Uzveši u obzir sve morfometrijske karaktere, jasno se uočava izdvajanje vrste *L. opacus* u negativnom delu x-ose (Slika 31).

Tabela 8. Faktor-strukturiran matriks analiziranih prediktora (pulovane unutargrupne korelacije kanonijskih varijabli)

<i>Varijabla</i>	<i>Koren 1</i>	<i>Koren 2</i>
ŠA	1,14127	0,09967
DG	-1,33980	-0,09304
DGR	0,23162	-0,66402
RO	0,36344	-0,05111
UD	0,46630	-0,20006
OP	-2,95100	1,17930
ŠP	-2,87086	1,41673
DP	-2,03622	-1,03522
ŠG	0,18229	-0,19526
DAB	-0,36380	-0,20730
ŠG	0,36096	0,90484
OD	0,96805	1,50155
PO	0,16019	0,08282
ODŠ	0,58227	-0,33648
MŠA	0,57527	-0,52240
DA	-0,13303	-0,04588
<b>Eigen-vrednost</b>	13,71338	1,96241
<b>Kumulativna proporcija</b>	0,87481	1,00000

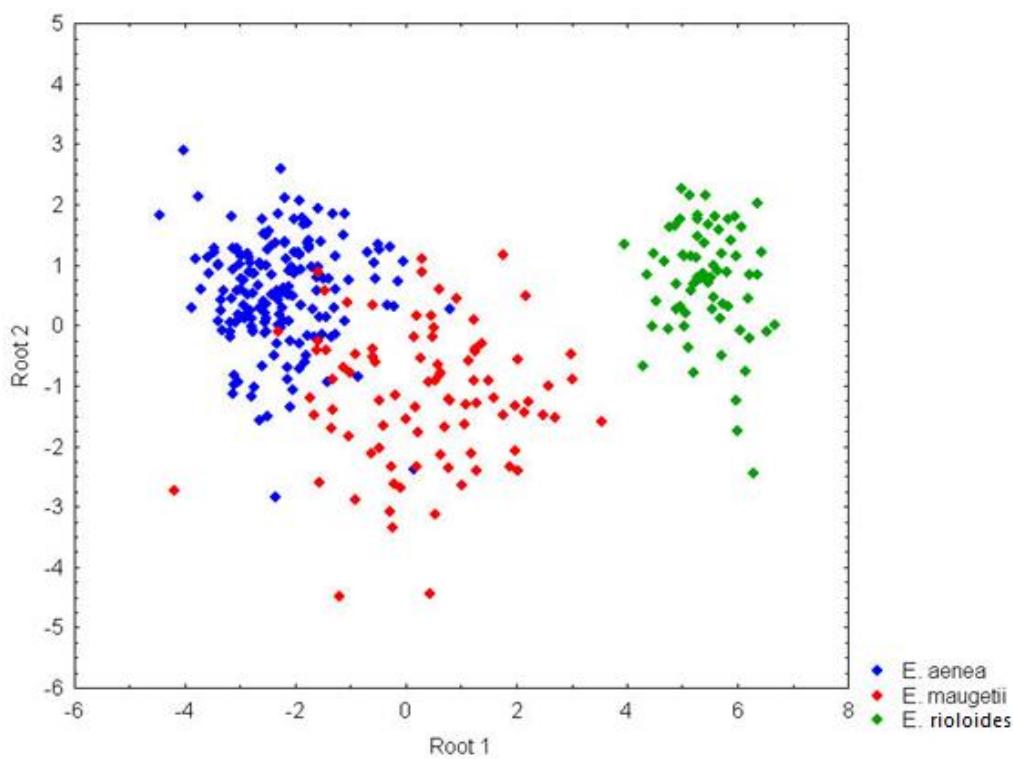


Slika 31. Razdvajanje vrsta roda *Limnius* na osnovu morfometrijskih karaktera (diskriminantna analiza)

Primenom diskriminantne analize (DA), kod analiziranih vrsta roda *Elmis*, faktor koji najviše doprinosi razdvajaju je dužina tela (UD), koja nosi 95% varijabilnosti po prvoj osi (Tabela 9). Uzevši u obzir sve morfometrijske karaktere, uočava se delimično izdvajanje vrste *E. cf. rioloides* u pozitivnom delu x-ose (Slika 32).

Tabela 9. Faktor-strukturirani matriks analiziranih prediktora (pulovane unutargrupne korelacije kanonijskih varijabli)

<i>Varijabla</i>	<i>Koren 1</i>	<i>Koren 2</i>
<b>UD</b>	-0,952092	0,33624
DP	-0,159763	1,63577
DG	-0,392670	-0,55043
OP	0,398034	-1,57460
DA	0,285593	0,00825
DAB	-0,334604	0,72976
ŠG	0,119583	-0,29183
MŠA	0,285891	-1,71628
ŠP	0,189047	-0,83125
ODŠ	0,243843	-1,62507
DG	0,127016	0,03912
RO	0,099293	0,09509
OD	0,146537	-0,05188
<i>Eigen-vrednost</i>	8,331911	0,77907
<b>Kumulativna proporcija</b>	0,914491	1,00000



Slika 32. Razdvajanje vrsta roda *Elmis* na osnovu morfometrijskih karaktera (diskriminantna analiza)

Prosečne vrednosti analiziranih morfometrijskih karaktera i indeksa vrsta roda *Limnius* date su Tabeli 4, a vrsta roda *Elmis* u Tabeli 5 (Prilog 1).

#### **4.1.4. SOM analiza: uticaj abiotičkih faktora na morfometrijsku varijabilnost – modeli vrsta**

U svrhu određivanja stepena korelisanosti analiziranih morfometrijskih karaktera sa merenim sredinskim faktorima, kao i vizualizacije intraspecijske morfometrijske varijabilnosti karaktera analiziranih vrsta familije Elmidae, korišćene su samoorganizuće mape (Kohonen, 1982). Konstruisane neuronske mreže prikazuju geografsku pozicioniranost i distribuciju jedinki svake vrste po lokalitetima (Slika 33a, b, c, d, e, f). Numeracija lokaliteta je kao u Tabeli 1 (Poglavlje 3.1.).

Kod vrste *Limnius intermedius* SOM analizom ustanovljeno je da su jedinke najviše grupisane unutar lokaliteta Ezeroto/Sivjak i morfometrijski najsličnije jedinkama sa lokalitetom Bijelina/Una, a one su najsličnije jedinkama sa lokalitetom Velika Šnjegotina/Šnjegotina (Slika 33a).

Kod vrste *Limnius volckmari* SOM distribucije jedinki unutar lokaliteta, agregacija klastera ukazuje da postoji distinkcija jedinki po lokalitetima, sa preklapanjem jedinki sa lokalitetom Đakovo/Studenica i Mrtvine/Gaberska Reka, Pašna Ravan/Trešnjica i Gornjak/Mlava, kao i Gornja Trešnjica/Trešnjica i Đakovo/Studenica, koje su međusobno morfometrijski najsličnije (Slika 33b).

Kod vrste *Limnius opacus* SOM analiza distribucije pokazuje da se jedinke jasno grupišu po lokalitetima (Slika 33c).

SOM analizom pozicioniranosti jedinki po lokalitetima vrste *Elmis cf. aenea* utvrđeno je da dolazi do preklapanja jedinki sa lokalitetom Đakovo/Studenica, Novi Grad/Sana i Pašna Ravan/Trešnjica, kao i sa lokalitetom Pašna Ravan/Trešnjica, Gornjak/Mlava, Novi Grad/Sana i Bijelila/Una, koje su po morfometrijskim karakterima međusobno najsličnije (Slika 33d).

SOM analizom pripadnosti jedinki vrste *Elmis cf. maugetii* po lokalitetima ustanovljeno je da nije utvrđena jasna agregacija jedinki po lokalitetima, već većina jedinki sa različitih lokaliteta pokazuju međusobnu morfometrijsku sličnost (Slika 33e).

Na osnovu SOM analize distribucije jedinki po lokalitetima, kod vrste *Elmis cf. rioloides* u većoj meri se poklapaju jedinke sa lokalitetom Đakovo/Studenica i Mrtvine/Gaberska Reka, a u manjoj meri sa lokalitetom Đakovo/Studenica i Gornjak/Mlava, ispoljavajući međusobnu sličnost mofometrijskih karaktera (Slika 33f).

Na neuronskim mrežama (Slike 34, 36, 38, 40, 42 i 44) skala gradijenta (desno) prikazuje opseg izmerenih vrednosti pojedinačnih sredinskih parametara (min-max) u odgovarajućim mernim jedinicama. Tamnije nijanse plave boje za svaki parametar ukazuju na njegovu visoku korelisanost sa minimalnim, dok tamnije nijanse crvene boje ukazuju na njegovu visoku korelisanost sa maksimalnim izmerenim vrednostima. Opadanje intenziteta zasenčenosti indikuje i opadanje vrednosti parametra. Metodologija SOM je opisana u Poglavlju 3.3.2.2.

Distribucija heksagonalnih neurona i njihovih klastera predstavlja vizuelnu korelaciju inteziteta morfometrijskih i sredinskih parametara, tj. SOM model za svaku

vrstu (Slike 35, 37, 39, 41, 43 i 45). Konstruisane neuronske mreže vizualizuju gradijent abiotičkih faktora (pasivni faktori) i morfometrijskih karaktera i indeksa vrsta (aktivni faktori). Na pomenutim neuronskim mrežama koloritna skala gradijenta (desno) prikazuje opseg izmerenih vrednosti (min-max) morfometrijskih karaktera (izražen u mm) i morfometrijskih indeksa. Različit intenzitet obojenosti heksagonalnih neurona dat je u odnosu na koloritnu skalu gradijenta uticaja abiotičkih faktora na morfometrijske parametre. Tamnije nijanse zasenčenosti boje za svaki parametar ukazuju na njegovu visoku korelisanost sa minimalnim/maksimalnim vrednostima u studiji. Opadanje intenziteta zasenčenosti indikuje i opadanje vrednosti parametra.

SOM analizom morfometrijskih karaktera vrste *Limnius intermedius* ustanovljeno je da postoji heterogena distribucija svih klastera, odnosno da je izražena intraspecijska varijabilnost svih karaktera (Slika 35), a jedinke su najsličnije po karakterima DG (dužina glave), PO (prečnik oka) i ŠA (širina abdomena), kao i po OD indeksu (odnos dužine i širine glave), koji su visoko korelisani sa nižim vrednostima izmerenih koncentracija nitrata,  $\text{NO}_3^-$  (Slika 34).

Na osnovu SOM analize morfometrijskih karaktera vrste *Limnius volckmari* utvrđeno je da je izražena intraspecijska varijabilnost svih karaktera (Slika 37). Najkonzervativniji karakteri su: RO (rastojanje između očiju), koji je visoko korelisan sa nižim vrednostima nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ), DP (dužina pronotuma) koji je visoko korelisan sa većim pH vrednostima i višim koncentracijama rastvorenog kiseonika (DO), kao i indeks odnosa dužine i maksimalne širine abdomena (ODŠ), koji je visoko korelisan sa prosečnim vrednostima elektroprovodljivosti, EC (Slika 36).

SOM analizom morfometrijskih karaktera vrste *Limnius opacus* (Slika 39) ustanovljeno je da su najkonzervativniji karakteri: ŠA (širina antena), DG (dužina glave) i RO (rastojanje između očiju), koji su u visokoj korelaciji sa nižim nadmorskim visinama, dok su karakteri DA (dužina antena), ŠP (širina pronotuma) i MŠA (maksimalna širina abdomena) u visokoj korelaciji sa većim pH vrednostima i višim koncentracijama rastvorenog kiseonika, DO (Slika 38). Heterogenost klastera ukazuje na postojanje veće morfometrijske varijabilnosti svih ostalih karaktera i indeksa (Slika 39).

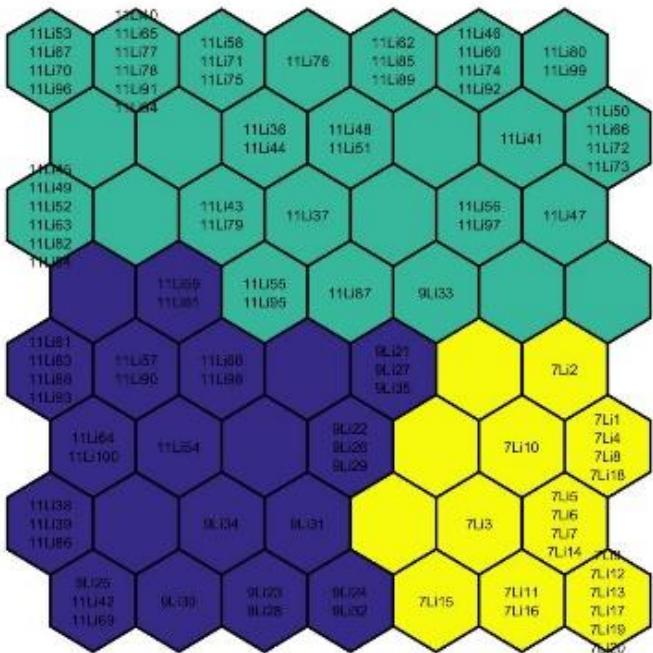
Na osnovu SOM analize morfometrijskih karaktera vrste *Elmis cf. aenea* (Slika 41) konstatovana je najveća sličnost jedinki sa svih lokaliteta po karakterima DP

(dužina pronotuma) i MŠA (maksimalna širina abdomena), koji su visoko korelisani sa većim pH vrednostima i višim koncentracijama rastvorenog kiseonika (DO), kao i po indeksu ODŠ (odnos dužine i maksimalne širine abdomena), koji je visoko korelisan sa nižim nadmorskim visinama (Slika 40). Za sve ostale analizirane morfometrijske karaktere i indekse utvrđena je veća interpopulaciona varijabilnost (Slika 41).

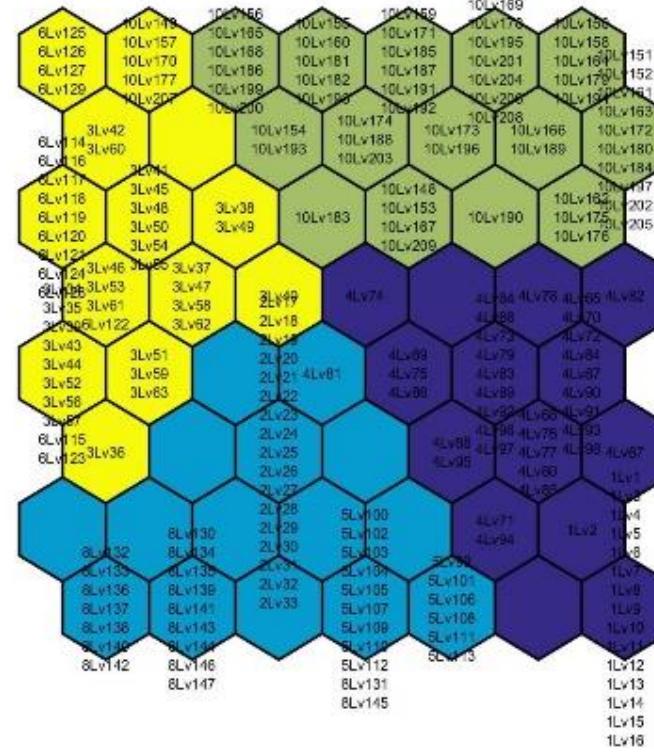
SOM analizom morfometrijskih karaktera vrste *Elmis cf. mauguetii* (Slika 43) otkrivena je heterogenost klastera svih analiziranih parametara, a najveću konzervativnost pokazuju karakteri: DG (dužina glave) i ŠA (širina abdomena), koji su visoko korelisani sa većim pH vrednostima i višim koncentracijama rastvorenog kiseonika (DO), kao i indeks dužine i širine pronotuma (OP), koji nije korelisan ni sa jednim sredinskim parametrom (Slika 42).

SOM analizom morfometrijskih karaktera vrste *Elmis cf. rioloides* (Slika 45), konstatovana je najveća sličnost jedinki sa svih lokaliteta u karakteru ŠI (širina od bočne ivice grebena do ivice pronotuma), kao i u indeksu OP (odnos dužine i širine pronotuma), koji su visoko korelisani sa većim temperaturama vode (T), pH vrednostima, procentualnim zasićenjem vode kiseonikom (% O<sub>2</sub>), kao i višim koncentracijama rastvorenog kiseonika, O<sub>2</sub> (Slika 44). Veći broj klastera utvrđen je za sve ostale analizirane morfometrijske karaktere i indekse, odnosno veća je intraspecijska varijabilnost (Slika 45).

a) *Limnius intermedius*

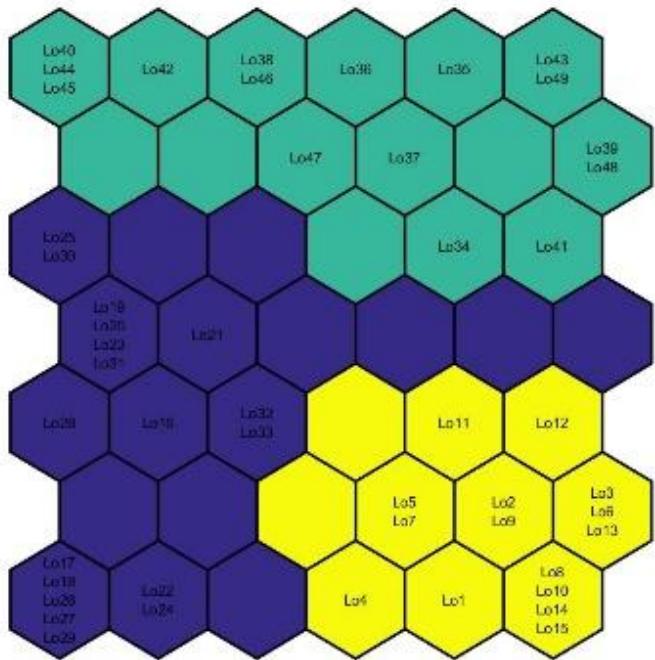


b) *Limnius volckmari*

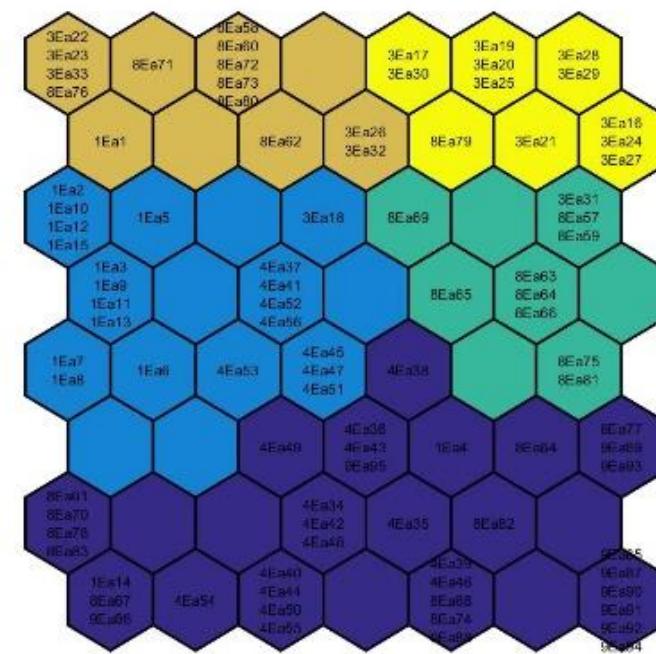


Slika 33. SOM za distribuciju jedinki po lokalitetima odabranih vrsta elmida. Napomena: prvi broj označava broj lokaliteta. Lokaliteti su numerisani kao u Tabeli 1.

c) *Limnius opacus*

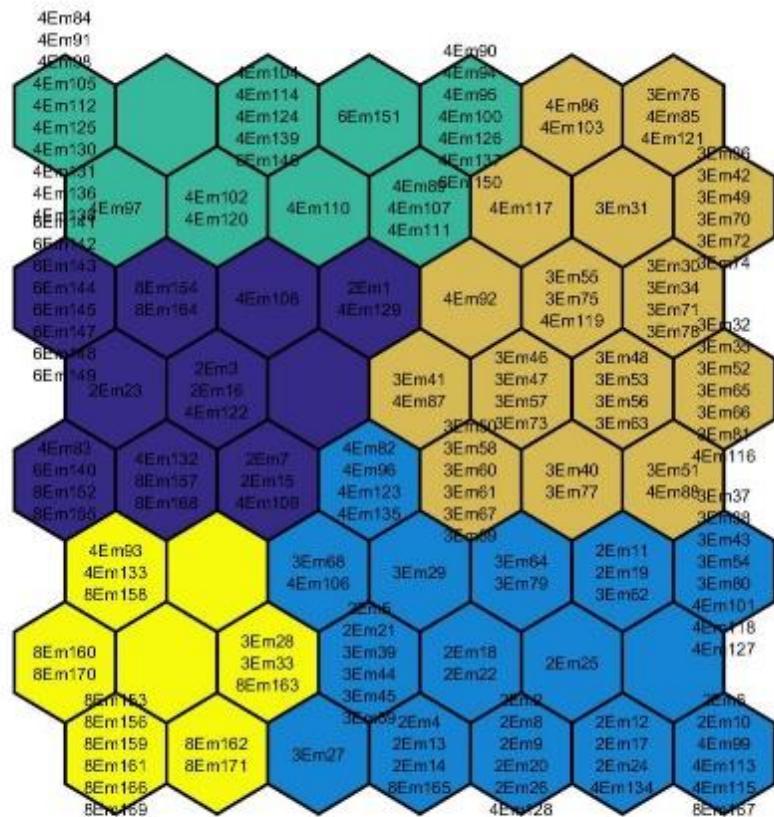


d) *Elmis cf. aenea*

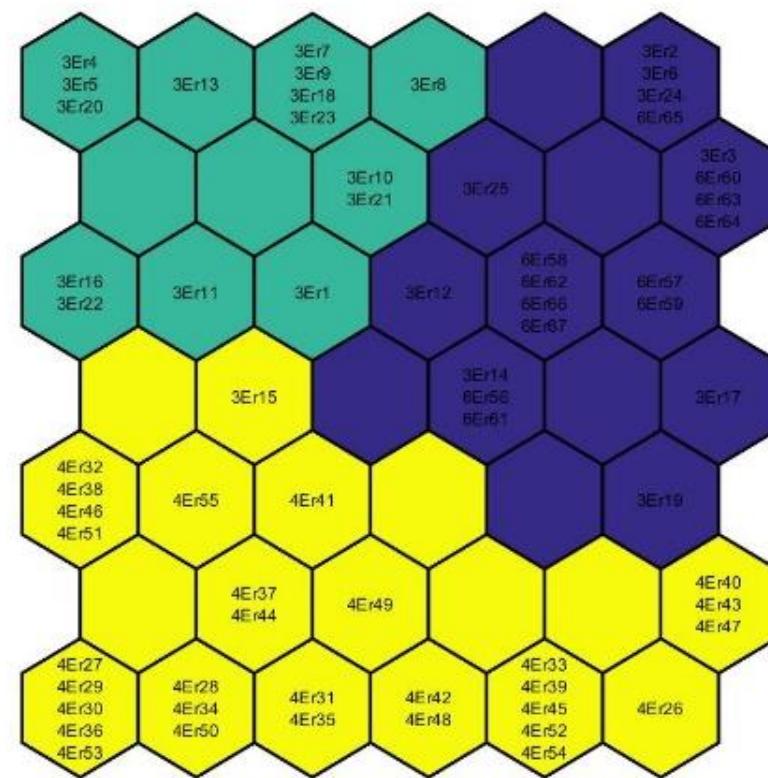


Nastavak slike 33. SOM za distribuciju jedinki po lokalitetima odabranih vrsta elmida

e) *Elmis cf. maugetii*

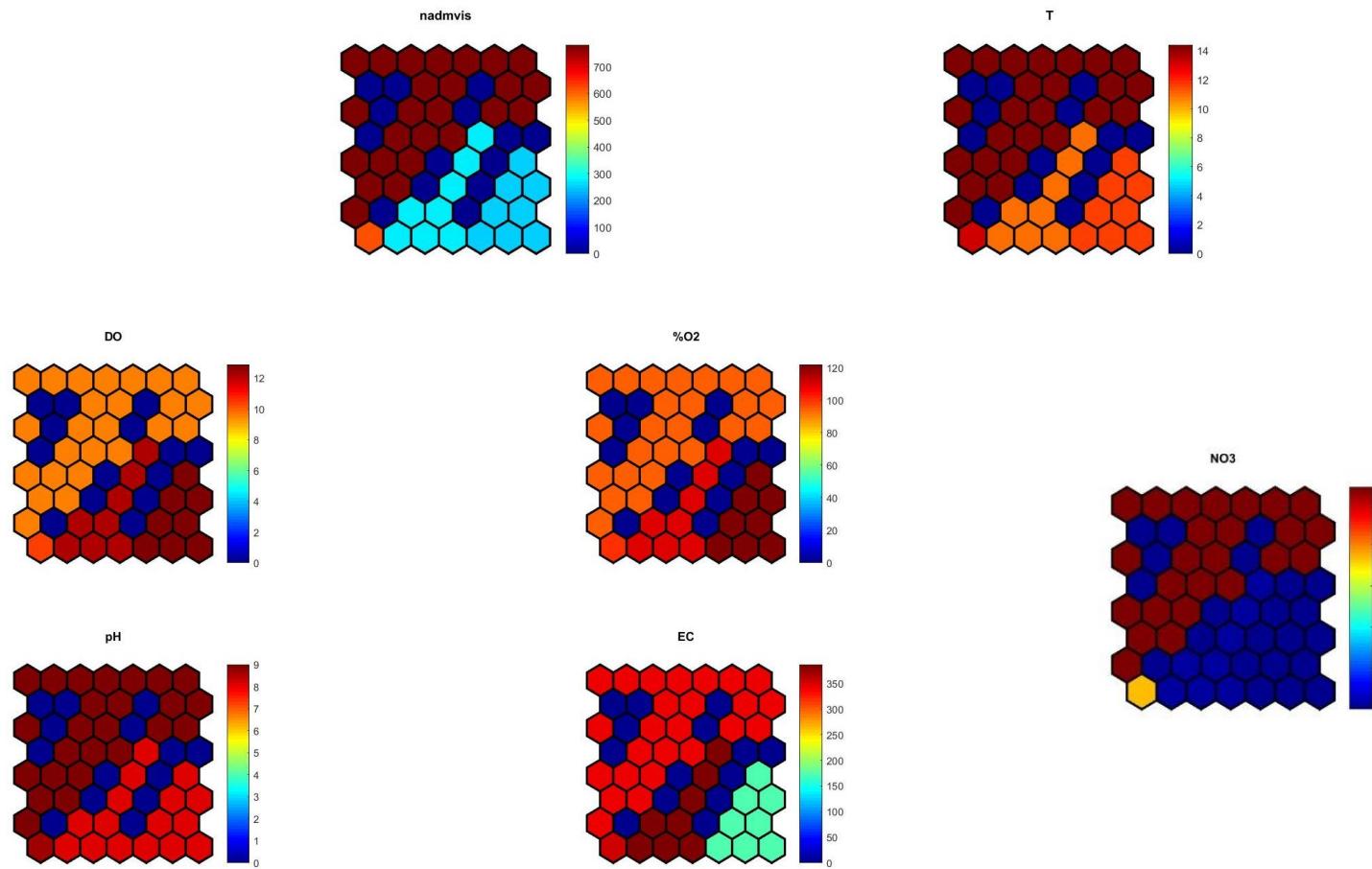


f) *Elmis cf. riolooides*



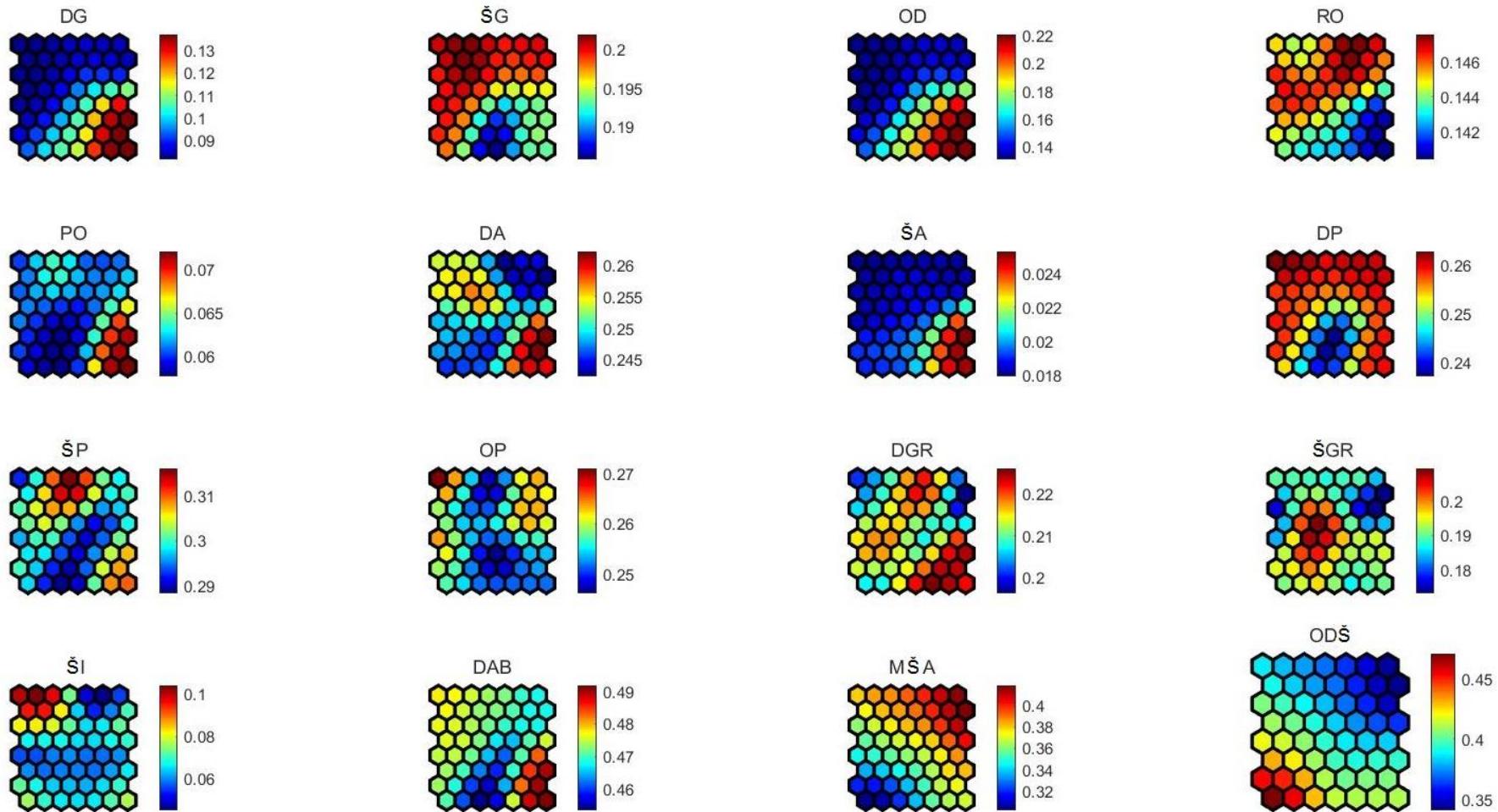
Nastavak slike 33. SOM za distribuciju jedinki po lokalitetima odabranih vrsta elmida

### *Limnius intermedius*



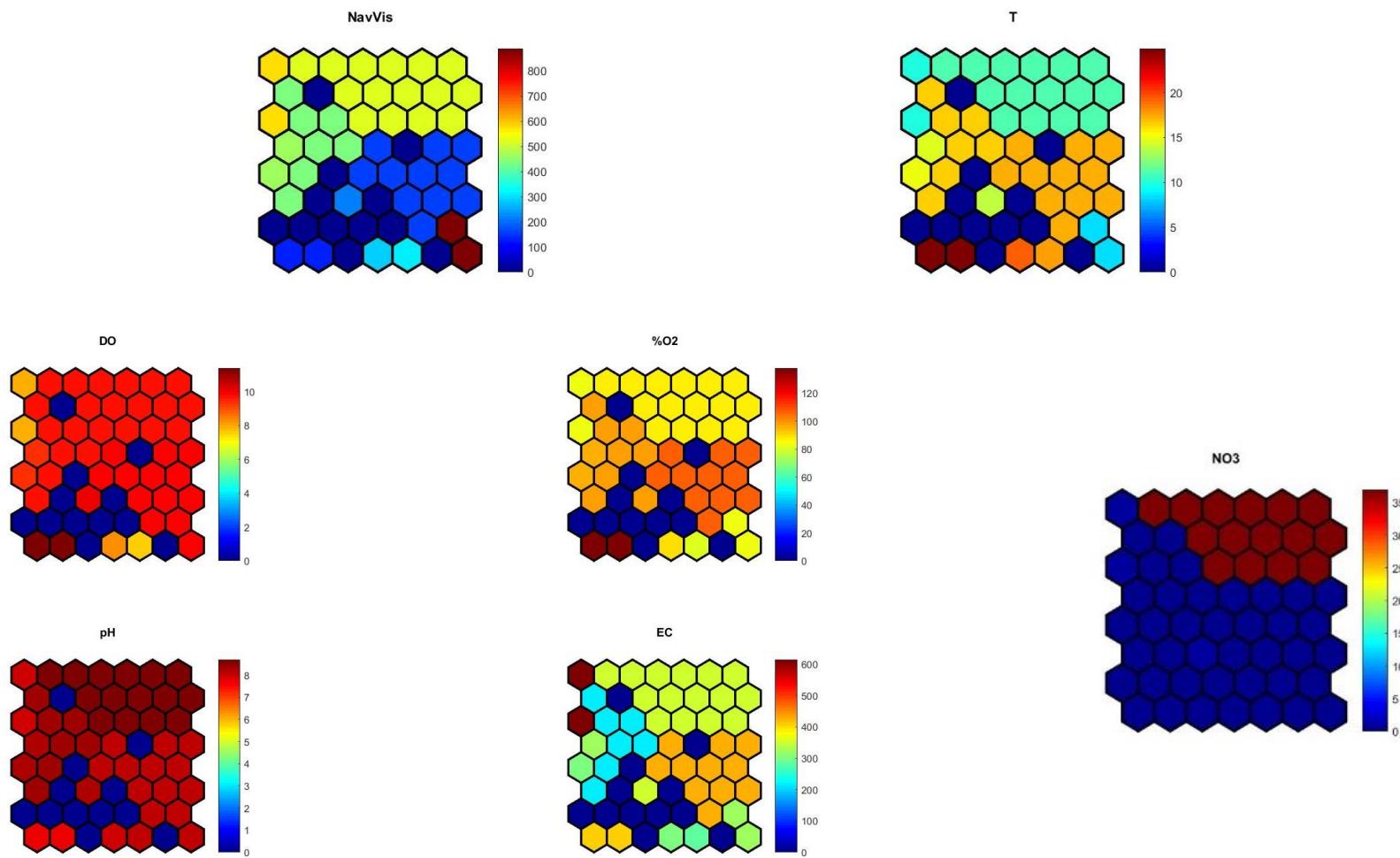
Slika 34. SOM vizualizacija sredinskih parametara za vrstu *Limnius intermedius*. Napomena: skraćenice parametara date su u Poglavlju 3.3.2.2.

### *Limnius intermedius*



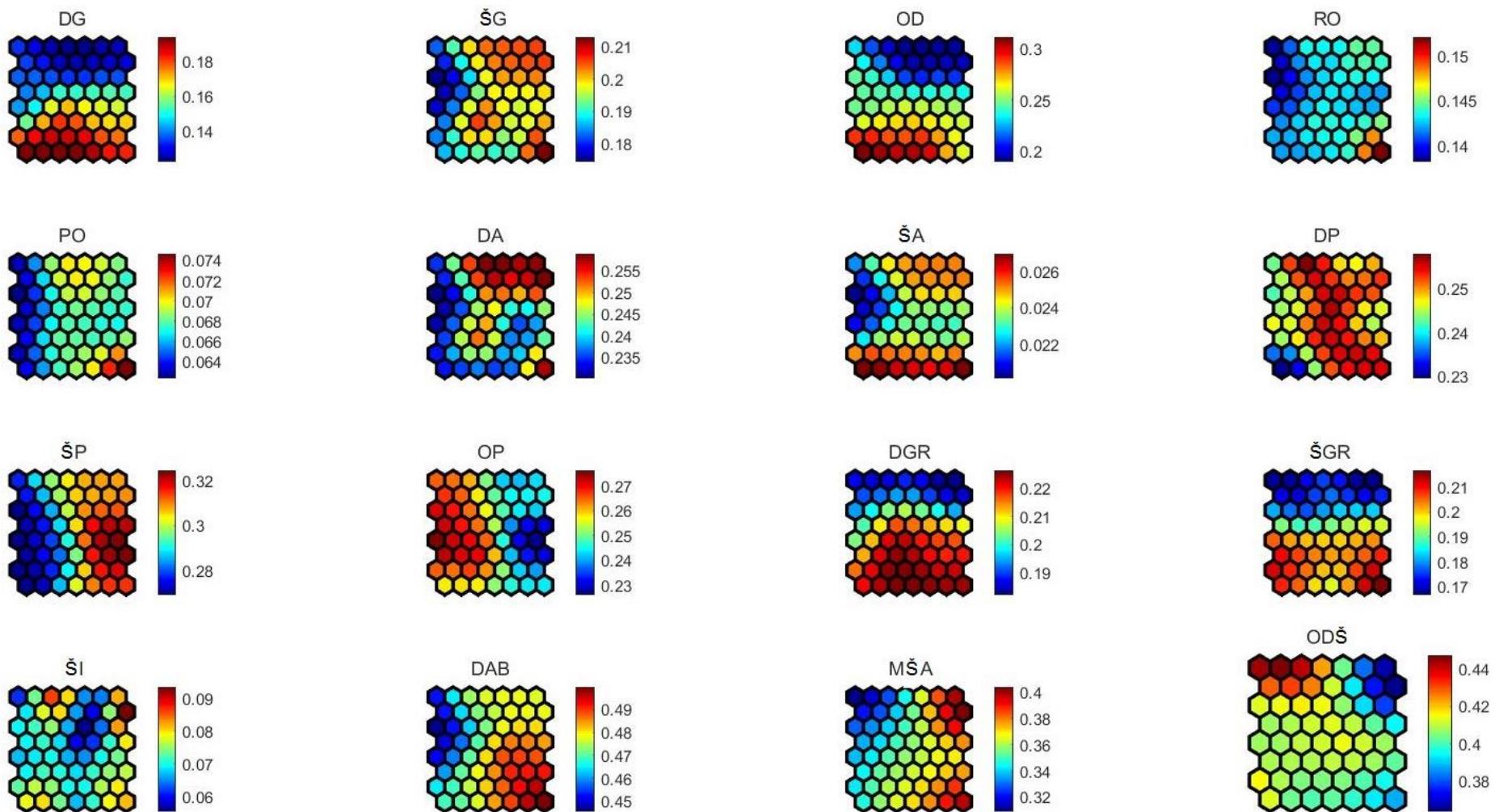
Slika 35. SOM vizualizacija analiziranih morfometrijskih karaktera i indeksa vrste *Limnius intermedius*. Napomena: skraćenice karaktera i indeksa date su u Poglavlju 3.3.2.2.

*Limnius volckmari*



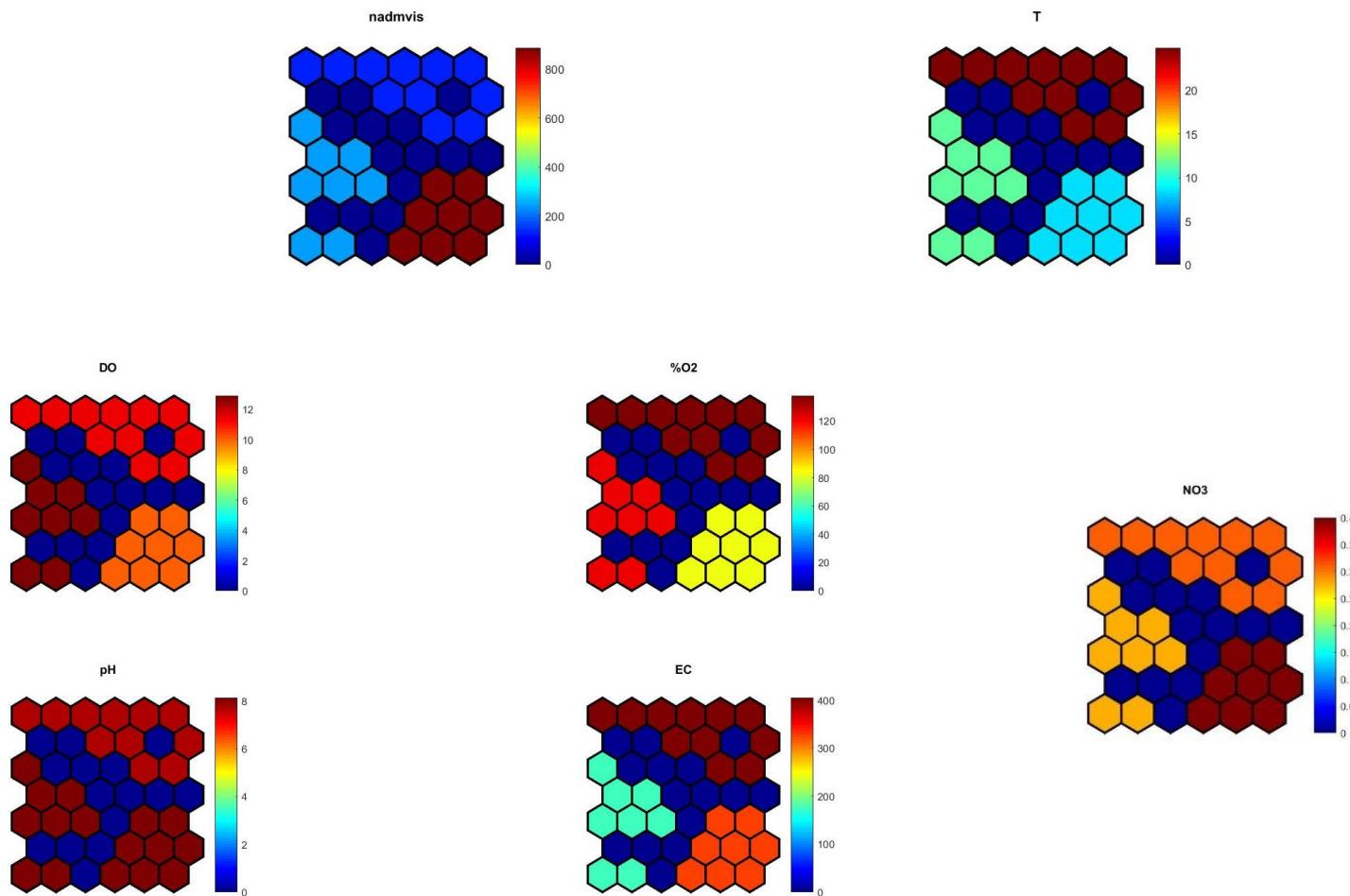
Slika 36. SOM vizualizacija sredinskih parametara za vrstu *Limnius volckmari*. Napomena: skraćenice parametara date su u Poglavlju 3.3.2.2.

### *Limnius volckmari*



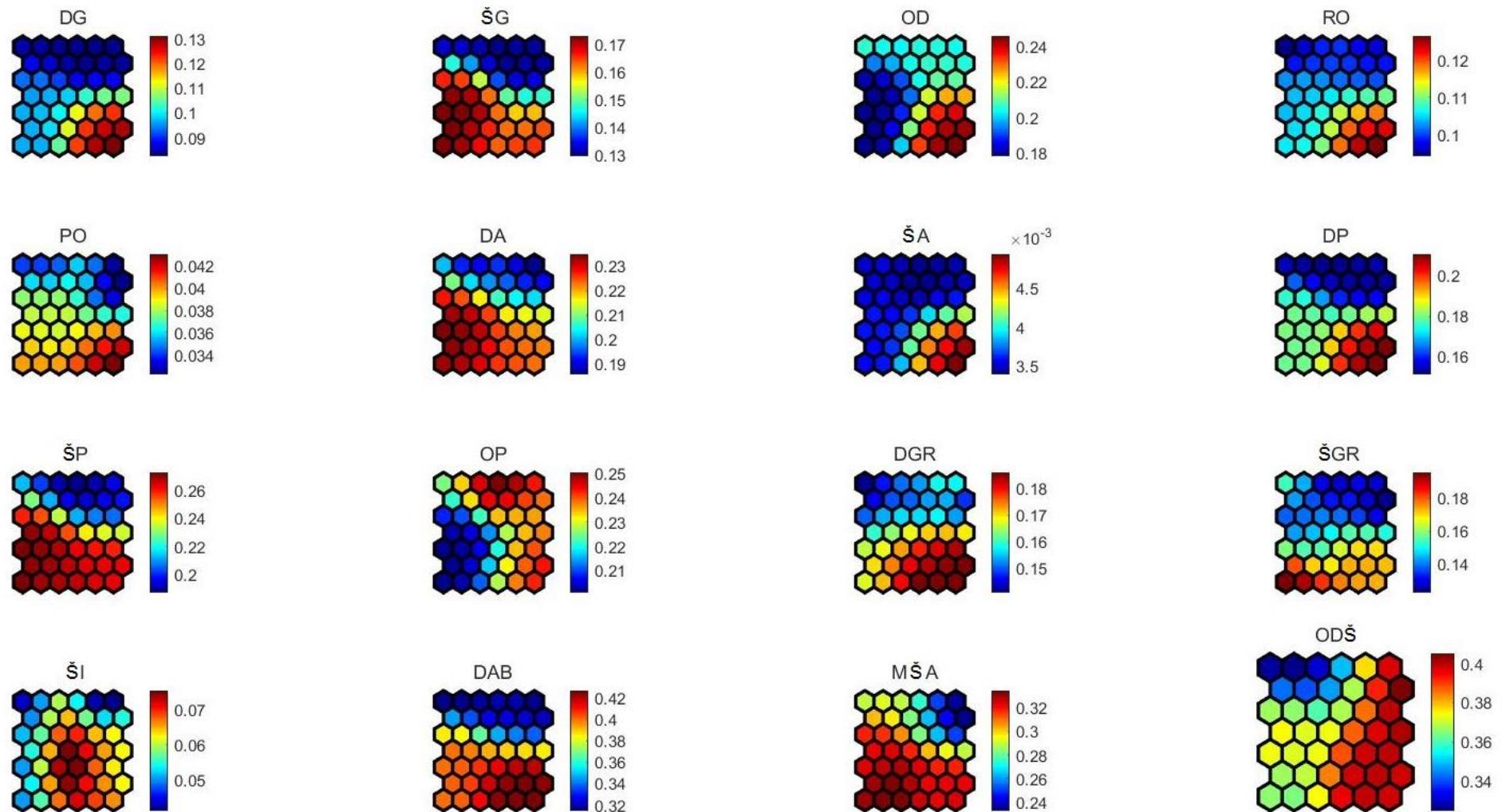
Slika 37. SOM vizualizacija analiziranih morfometrijskih karaktera i indeksa vrste *Limnius volckmari*. Napomena: skraćenice karaktera i indeksa date su u Poglavlju 3.3.2.2.

### *Limnius opacus*



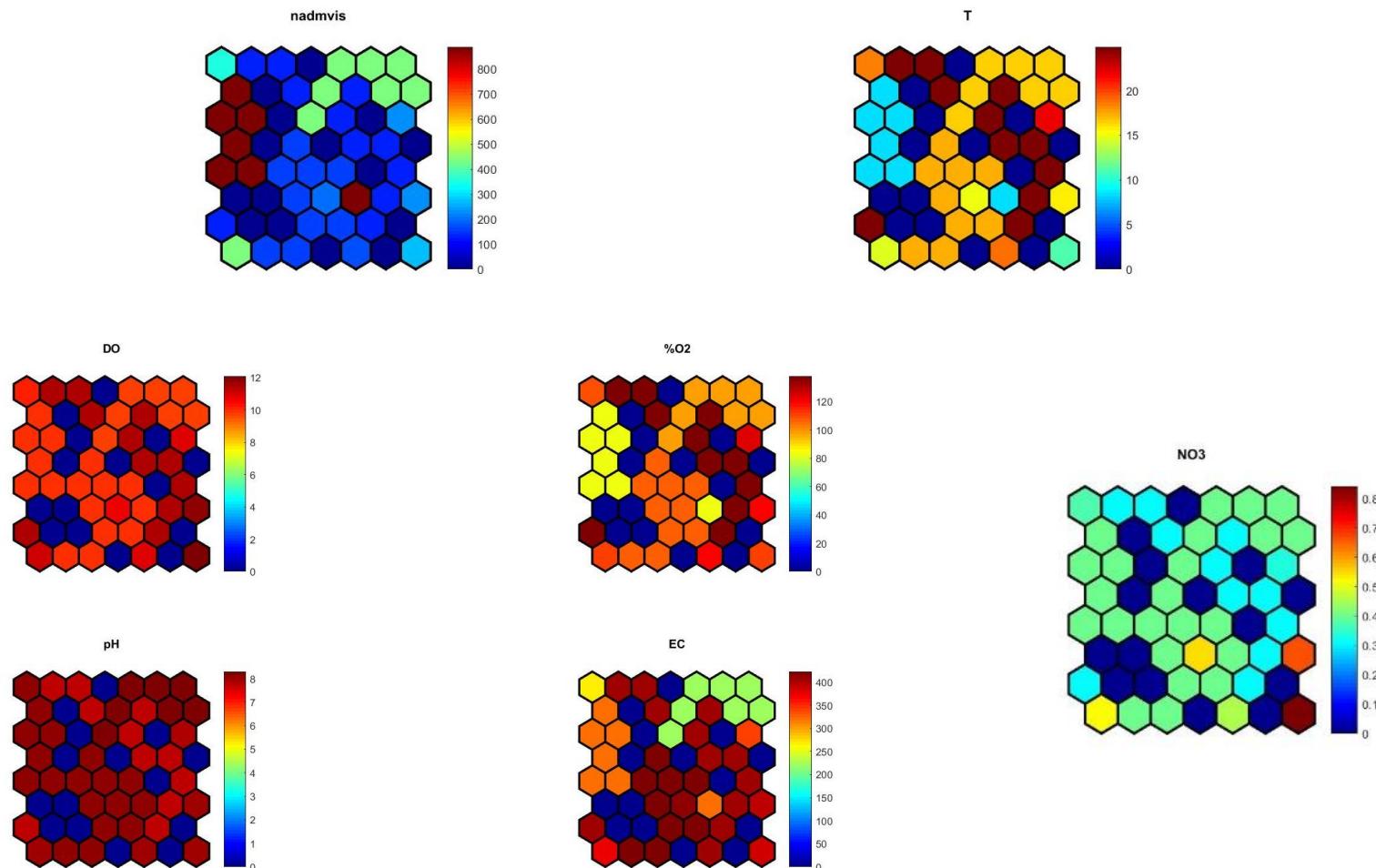
Slika 38. SOM vizualizacija sredinskih parametara za vrstu *Limnius opacus*. Napomena: skraćenice parametara date su Poglavlju 3.3.2.2.

### *Limnius opacus*



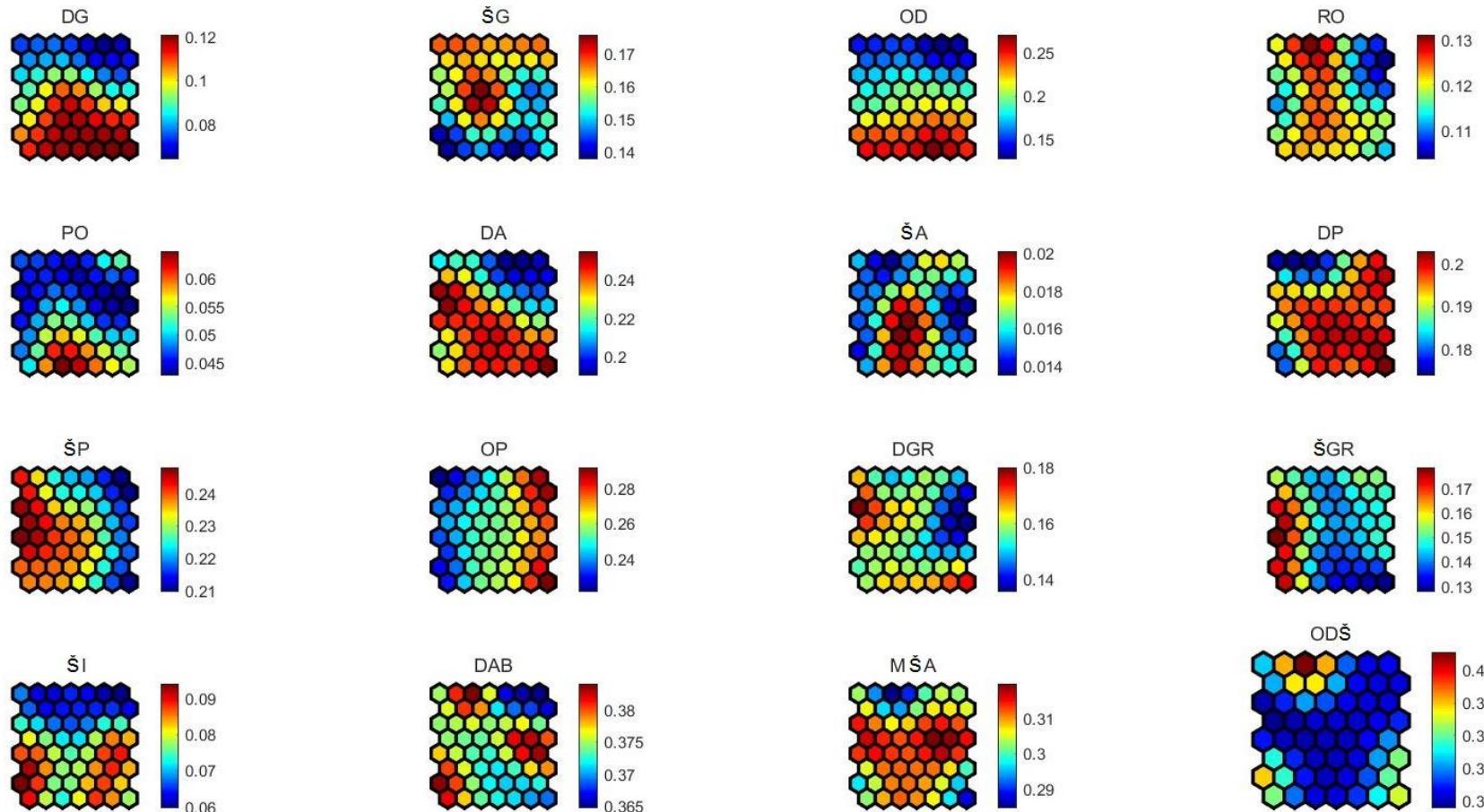
Slika 39. SOM vizualizacija analiziranih morfometrijskih karaktera i indeksa vrste *Limnius opacus*. Napomena: skraćenice karaktera i indeksa date su u Poglavlju 3.3.2.2.

*Elmis cf. aenea*



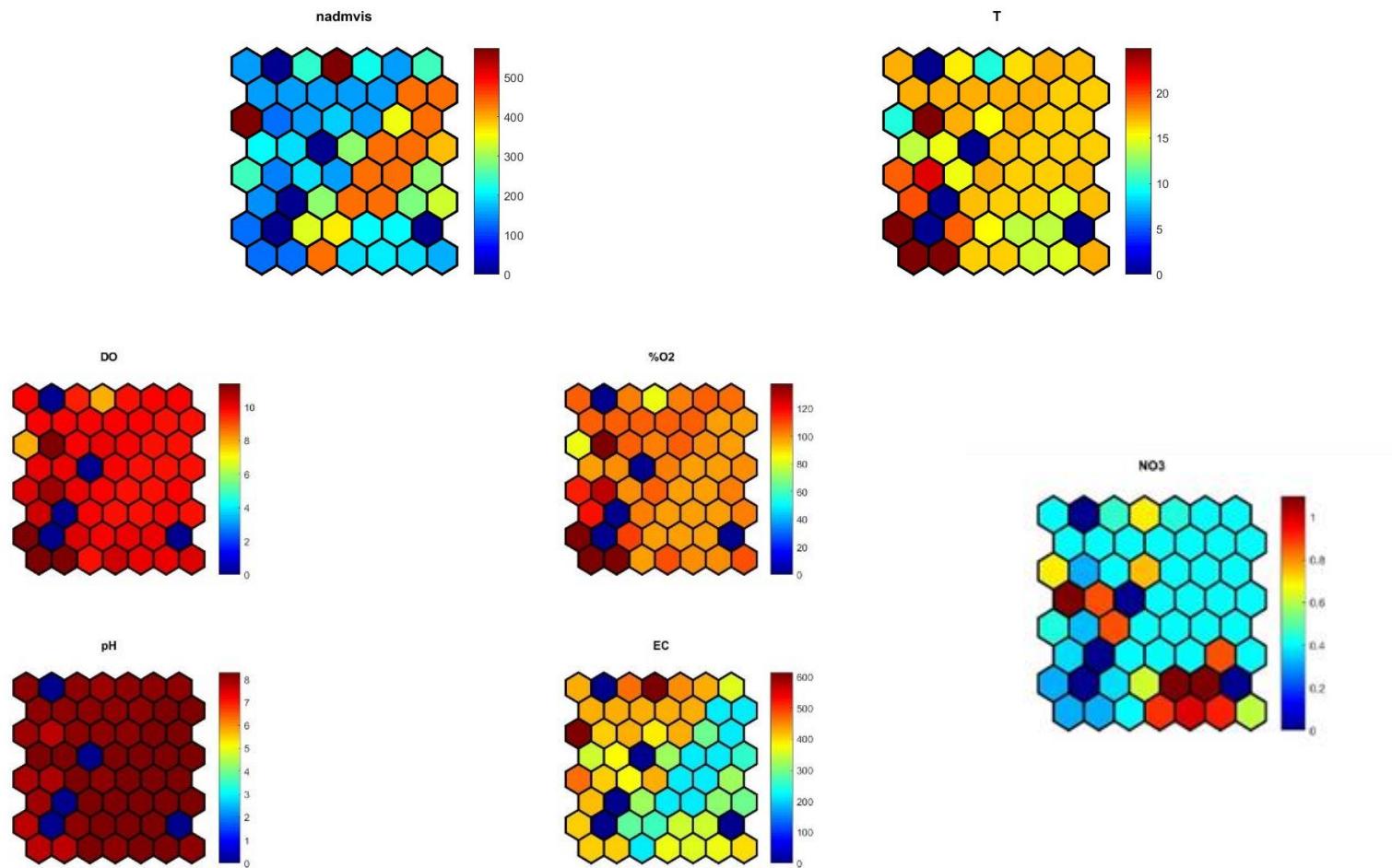
Slika 40. SOM vizualizacija sredinskih parametara za vrstu *Elmis cf. aenea*. Napomena: skraćenice parametara date su u Poglavlju 3.3.2.2.

*Elmis cf. aenea*



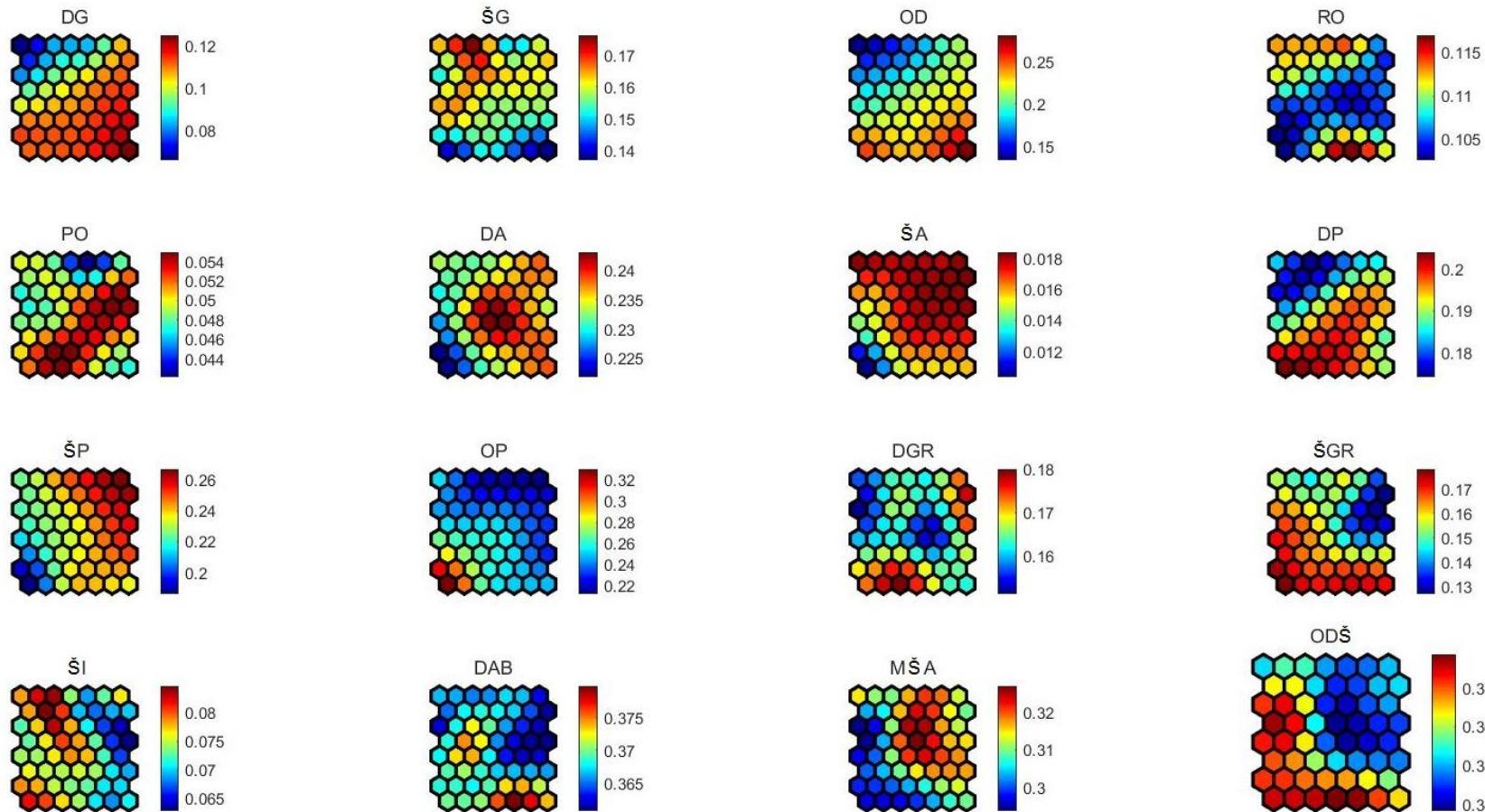
Slika 41. SOM vizualizacija analiziranih morfometrijskih karaktera i indeksa vrste *Elmis cf. aenea*. Napomena: skraćenice karaktera i indeksa date su u Poglavlju 3.3.2.2.

*Elmis cf. maugetii*



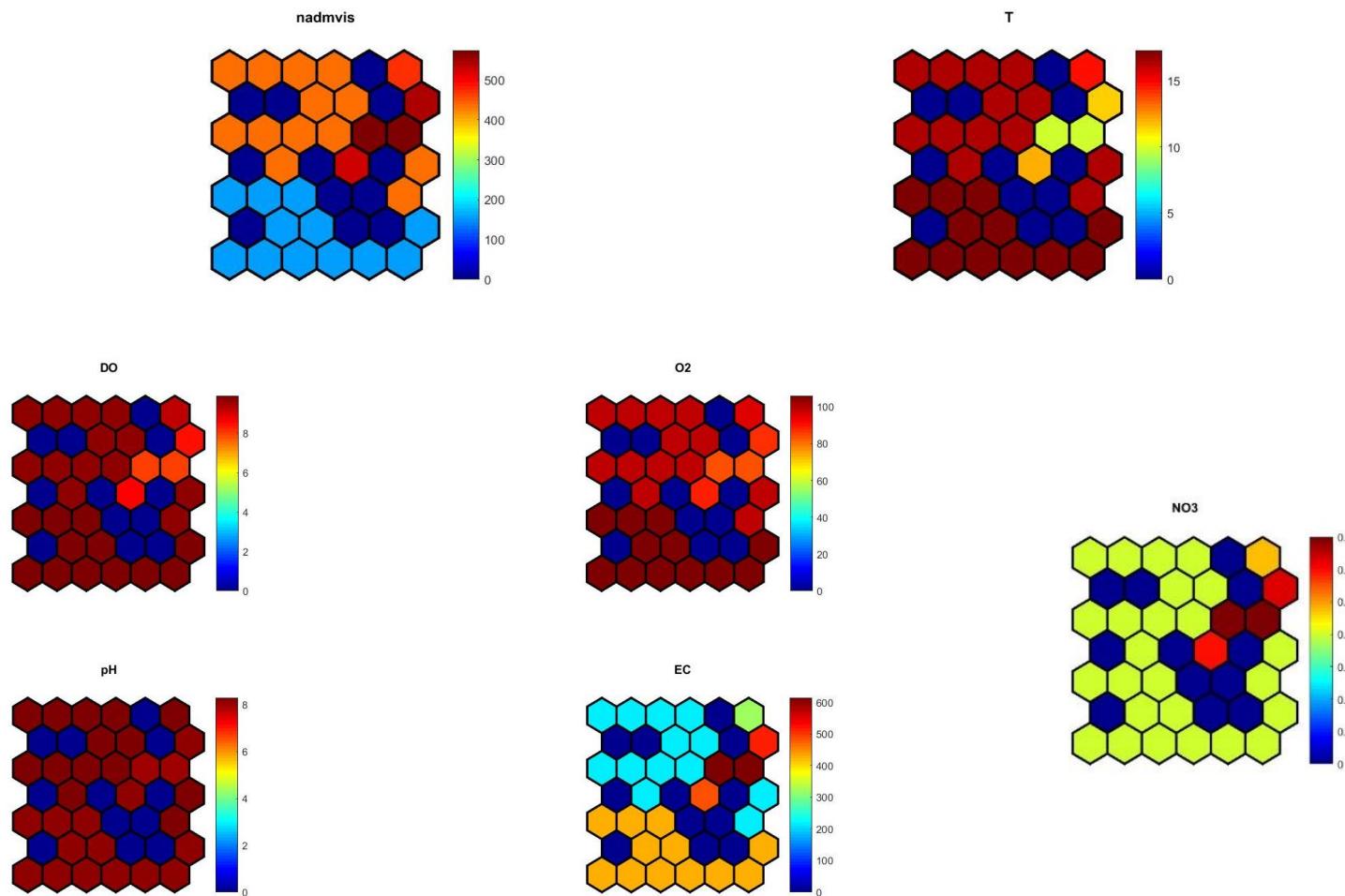
Slika 42. SOM vizualizacija sredinskih parametara za vrstu *Elmis cf. maugetii*. Napomena: skraćenice parametara date su u Poglavlju 3.3.2.2.

*Elmis cf. maugetii*



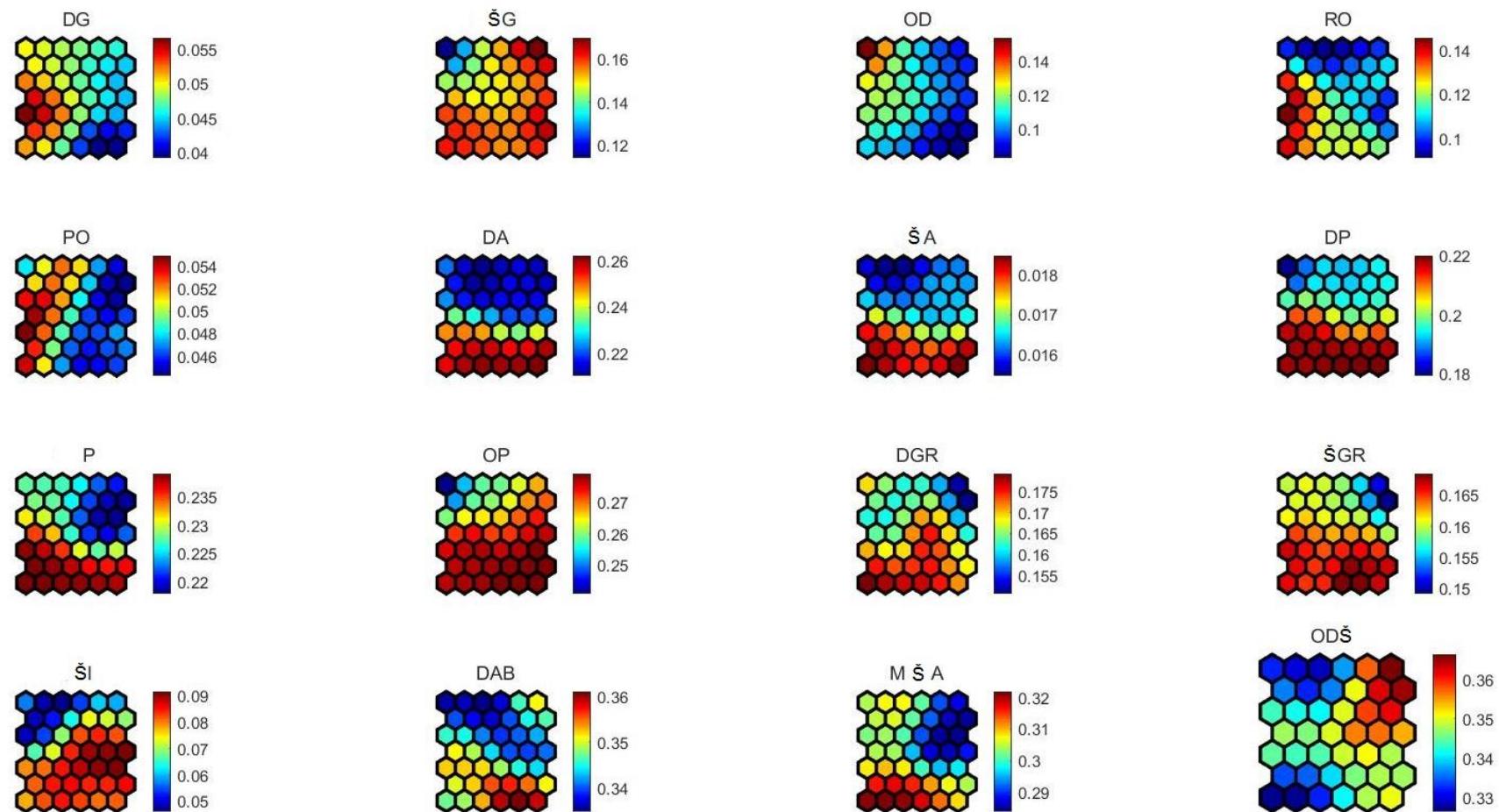
Slika 43. SOM vizualizacija analiziranih morfometrijskih karaktera i indeksa vrste *Elmis cf. maugetii*. Napomena: skraćenice karaktera i indeksa date su u Poglavlju 3.3.2.2.

*Elmis cf. rioloides*



Slika 44. SOM vizualizacija sredinskih parametara za vrstu *Elmis cf. rioloides*. Napomena: skraćenice parametara date su u Poglavlju 3.3.2.2.

### *Elmis cf. rioloides*



Slika 45. SOM vizualizacija analiziranih morfometrijskih karaktera i indeksa vrste *Elmis cf. rioloides*. Napomena: skraćenice karaktera i indeksa date su u Poglavlju 3.3.2.2.

## **4.2. Uticaj hidroloških parametara na morfometrijske karaktere**

Kako bi se ustanovila korelacija veličine adultnih jedinki i parametara hidrološkog režima vodotoka (vodostaja i proticaja), kao i dubine uzorkovanja, izabранo je šest brdsko-planinskih profila reka u Srbiji i vrsta *Elmis maugetii* Latreille, 1802 kao model (opisano u Poglavlju 3.3.3), kako bi se testiralo da li hidraulički pritisak vode utiče na veličinu jedinki. Imajući u vidu sedentarnost i relativno slabu pokretljivost elmida unutar akvatičnih staništa, pretpostavljeno je da su njihove fenotipske adaptacije na lokalne sredinske uslove izraženije. Jednofaktorskim ANOVA testom dokazano je da postoje značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) u veličini jedinki različitih grupa (populacija) vrste *E. maugetii* (Tabela 10). U Tabeli 11 dati su osnovni podaci o lokalitetima i merenjima vrste *E. maugetii*. Vrednosti izmerenih fizičkih i hemijskih parametara (temperatura i zasićenost vode kiseonikom) na lokalitetima dati su u Tabeli 2 (Poglavlje 3.3.3).

Tabela 10. ANOVA test – uticaj parametara hidrološkog režima vodotoka na veličinu jedinki vrste *Elmis maugetii* na istraživanim lokalitetima

Dužina tela	SS	Df	MS	F	p	F crit
Između lokaliteta	2,522	5	0,504	27,67	0,001	2,275
Ukupno	5,239	154				

Tabela 11. *Elmis maugetii* Latreille, 1802 - morfometrijska varijabilnost odabranih karaktera u odnosu na vodostaj, proticaj i dubinu uzorkovanja

Profil	Tulare/Tular ska Reka	Trnski Odorovci/Jerma	Mrtvine/Gaberška Reka	Krivi Dol/Visočica	Crnajka/Crnajka	Manastir Manasija/Resava
Dubina uzorkovanja (m)	0,5	1,0	0,7	0,3	0,5	1,0
Vodostaj (cm)	17	47	58	21	20	23
Proticaj ( $m^3 s^{-1}$ )	0,016	1,270	0,868	0,610	0,064	2,070
Ukupan broj izmerenih adultnih jedinki	16	22	40	18	17	42
Prosečna dužina tela-PDT (mm)	1,84	2,12	2,10	2,05	1,89	2,23
Prosečna dužina glave-PDG (mm)	0,24	0,30	0,29	0,29	0,25	0,31
Prosečna širina protoraksa-PŠP (mm)	0,59	0,71	0,69	0,66	0,69	0,72

Metodom linearne regresije (Kenney i Keeping, 1962) ustanovljeno je da od svih analiziranih parametara hidrološkog režima vodotoka, jedino proticaj značajno korelisan sa svim analiziranim morfometrijskim karakterima ( $p \leq 0,05$ ), dok ne postoji zavisnost vodostaja i dubine uzorkovanja ni sa jednim morfometrijskim karakterom (Tabela 12).

Tabela 12. Testiranje značajnosti vodostaja, dubine uzorkovanja i proticaja sa morfometrijskim karakterima vrste *Elmis maugetii* linearnom regresijom. Skraćenice: PDG - prosečna dužina glave, PŠP - prosečna širina protoraksa, PDT - prosečna dužina tela

Vodostaj/Morfometrijski karakter	PDG	PŠP	PDT
F	1,139	0,9635	1,038
DFn, DFd	1,4	1,4	1,4
p	0,3460	0,3819	0,3659
<b>Dubina uzorkovanja /Morfometrijski karakter</b>			
F	2,431	2,982	3,675
DFn, DFd	1,4	1,4	1,4
p	0,1940	0,1593	0,1277
<b>Proticaj/Morfometrijski karakter</b>			
F	18,3	22,89	42,30
DFn, DFd	1,4	1,4	1,4
p	<b>0,0129</b>	<b>0,0087</b>	<b>0,0029</b>

#### 4.3. Uticaj abiotičkih faktora na populacije odabralih vrsta familije Elmidae

Dobijene vrednosti fizičkih i hemijskih parametara na ispitivanim lokalitetima prikazane su u Tabeli 1 u Prilogu 1. Temperatura vode se kretala od 8,3 °C (Paša Ravan/Trešnjica) do 24,9 °C (Novi Grad/Sana), što odgovara sezonskom aspektu tip-specifičnih uslova u vodotoku. Vrednosti koncentracije rastvorenog kiseonika ( $O_2$ ), i procentualne zasićenosti vode kiseonikom bile su na svim lokalitetima visoke, osim na lokalitetima Plavna/Zamna i Mrtvine/Gaberska/Reka, gde bile nešto niže (7,6 mg/l, 80%; odnosno 8 mg/l, 83%). Izmerene pH vrednosti na svim lokalitetima ukazuju na alkalne, odnosno visoko alkalne vode na jednom lokalitetu (Ezeroto/Sivjak; pH vrednost je 9,00). Elektroprovodljivost ( $\mu S/cm$ ) se kretala od 172 (Velika

Šnjegotina/Šnjegotina) do 615 (Mrtvine/Gaberska Reka). Izmerene koncentracije nitrata ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) kretale su se od 0,28 mg/l (Velika Šnjegotina/Šnjegotina) do 27 mg/l (Ezeroto/Sivijak).

Tokom istraživanja zabeleženo je da je u zajednici na istim lokalitetima koegzistiralo više vrsta familije Elmidae, na pojedinim i do četiri vrste. U Tabeli 13 dat je prikaz registrovanih vrsta elmida na istim lokalitetima.

Tabela 13. Registrovane vrste roda *Limnius* i *Elmis* u zajednicama ispitivanih lokaliteta. Numeracija lokaliteta: Srbija (1-Pašna Ravan/Trešnjica, 2-Gornja Trešnjica/Trešnjica, 3-Đakovo/Studenica, 4-Gornjak/Mlava, 6-Mrtvine/Gaberska Reka), Bosna i Hercegovina (7-Velika Šnjegotina/Šnjegotina, 8-Novi Grad/Sana, 9-Bijelila/Una)

Lokalitet	Pašna Ravan/Trešnjica	Gornja Trešnjica/Trešnjica	Đakovo/Studenica	Gornjak/Mlava	Mrtvine/Gaberska Reka	Velika Šnjegotina/Šnjegotina	Novi Grad/Sana	Bijelila/Una
Vrsta	<i>L.opacus</i>	<i>L.volckmari</i>	<i>L.volckmari</i>	<i>L.volckmari</i>	<i>L.volckmari</i>	<i>L.intermedius</i>	<i>L.opacus</i>	<i>L.intermedius</i>
	<i>L.volckmari</i>	<i>E.cf.maugetii</i>	<i>E.cf.aenea</i>	<i>E.cf.aenea</i>	<i>E.cf.maugetii</i>	<i>L.opacus</i>	<i>L.volckmari</i>	<i>E.cf.aenea</i>
	<i>E.cf.aenea</i>		<i>E.cf.riolooides</i>	<i>E.cf.riolooides</i>	<i>E.cf.riolooides</i>		<i>E.cf.aenea</i>	<i>E.cf.maugetii</i>

Razmatrajući tipologiju istraživanog područja, lokaliteti Pašna Ravan/Trešnjica (limnofaunistički region 5), Plavna/Zamna (prelaz regiona 7 i 5) i Ezeroto/Sivijak (region 7) imaju slične tipove mikrostaništa, i nalaze se u izvorišnim delovima vodotokova planinskih područja. Takođe, slične tipove mikrostaništa imaju lokaliteti: Gornja/Trešnjica (region 5), Đakovo/Studenica (region 5), Gornjak/Mlava (prelaz regiona 7 i 5), Mrtvine/Gaberska Reka (region 7), Bijelila/Una (region 5) i Kozijata/nizvodno od hidroelektrane „Maluša“ (region 7), te lokaliteti Velika Šnjegotina/Šnjegotina (region 5) i Novi Grad/Sana (region 5), koji se pretežno nalaze u brdsko-planinskim područjima Balkanskog poluostrva. Konstatovano je da su sve

odabrane vrste elmida na svim obrađenim lokalitetima nađene u staništima gde su bile prisutne mahovine i epilitska vegetacija.

Takođe, analizirana je korelacija sastava i strukture populacija tri vrste roda *Limnius* (*L. volckmari*, *L. intermedius* i *L. opacus*), kao i tri vrste roda *Elmis* (*E. cf. aenea*, *E. cf. maugetii* i *E. cf. riolooides*) i sledećih fizičkih i fizičko-hemijskih parametara vode određenih prethodnom selekcijom kanoniske korespondentne analize: pH, temperatura vode, elektroprovodljivost, rastvoren kiseonik, procentualna zasićenost vode kiseonikom i nitrati (Tabele 14a i 15a).

Tako je na osnovu kanoniske korespondentne analize, posmatranjem odnosa parametara i vrsta u sredinskim gradijentima, utvrđeno je da postoji odvajanje po vrstama roda *Limnius*, ali i po faktorima. Izmereni fizičko-hemijski parametri predstavljeni su odgovarajućim vektorima na graficima (Slike 46 i 47).

Tabela 14.

- a) Gradijent uticaja fizičkih i hemijskih parametara na populacije vrsta roda *Limnius* na istraživanim lokalitetima kao rezultat prethodne selekcije

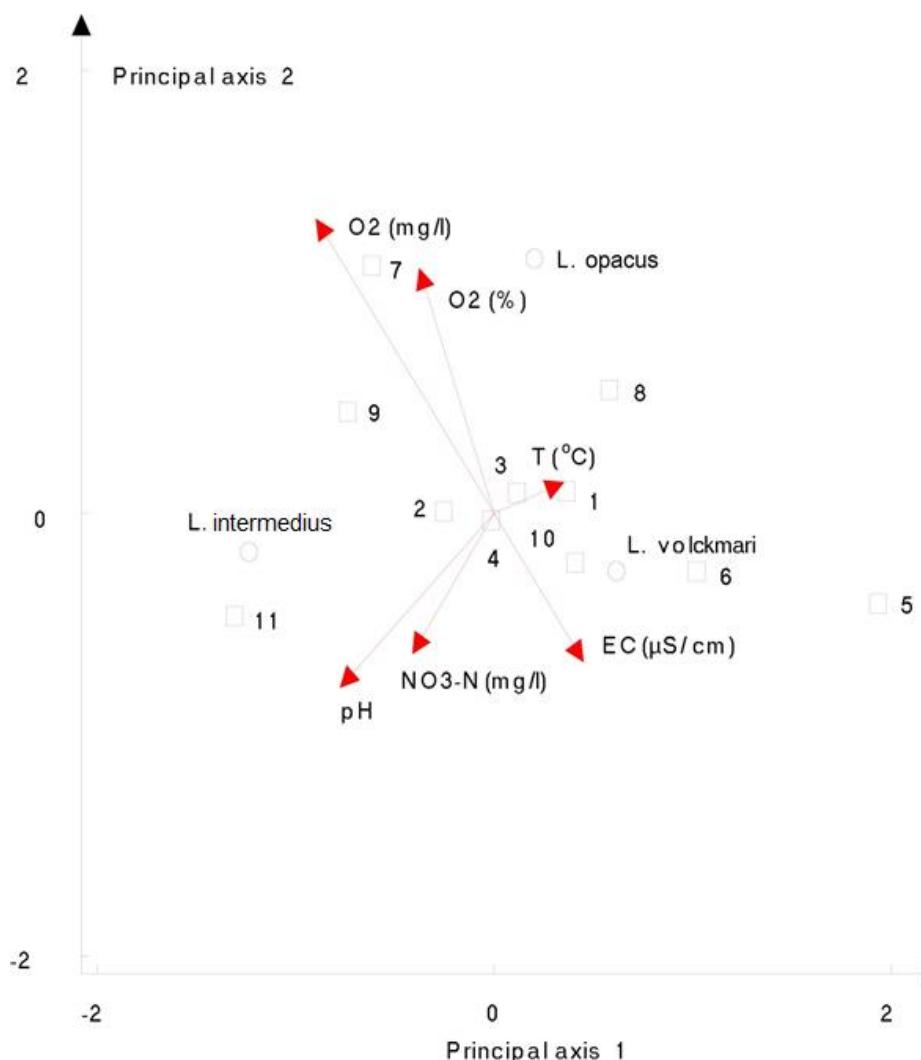
Varijabla	Eigen-vrednost	F statistika	Verovatnoća
pH	0,3046	3,050	0,299
Rastvoren O <sub>2</sub> (mgL <sup>-1</sup> )	0,3461	3,615	0,027
Nitrati (NO <sub>3</sub> -N) (mgL <sup>-1</sup> )	0,1307	1,115	0,174
Elektroprovodljivost (μS/cm)	0,0851	0,699	0,288
Temperatura vode (°C)	0,0069	0,053	0,303
Zasićenje vode kiseonikom (%)	0,0058	0,045	0,307

- b) Udeo varijabilnosti duž prve dve kanoniske ose – vrste roda *Limnius*

Nefitovana kanonijska osa	Udeo varijabilnosti (%)
1	70
2	30

c) Monte Carlo test

Monte Carlo test	R kvadrat	F koeficijent	Verovatnoća
1000 permutations	0,675	0,146	0,042



Slika 46. Kanonijska korespondentna analiza (CCA) vrsta roda *Limnius* i sredinskih parametara. Lokaliteti: Srbija (1-Pašna Ravan/Trešnjica, 2-Gornja Trešnjica/Trešnjica, 3-Đakovo/Studenica, 4-Gornjak/Mlava, 5-Plavna/Zamna, 6-Mrtvine/Gaberska Reka); Bosna i Hercegovina (7-Velika Šnjegotina/Šnjegotina, 8-Novi Grad/Sana, 9-Bijelila/Una); Bugarska (10-Kozijata/nizvodno od hidroelektrane „Maluša”, 11-Ezeroto/Sivijak)

U odnosu na prvu kanonijsku osu (Slika 46) uočava se izdvajanje vrsta *L. volckmari* i *L. opacus* u pozitivnom delu, odnosno vrste *L. intermedius* u negativnom delu ose. Takođe, u odnosu na prvu kanonijsku osu, koja opisuje 70% varijabilnosti

(Tabela 14b), temperatura i elektropovodljivost orijentisani su u istom smeru, i uočava se pozitivna korelacija sa vrstom *L. volckmari*, a delimično i *L. opacus* (Slika 46). Monte Carlo permutacionim testom (1000 permutacija) dokazana je statistička značajnost sume svih *eigen*-vrednosti pojedinačnih faktora ( $p \leq 0,05$ ; Tabela 14c). Koncentracija rastvorenog kiseonika ( $O_2$ ), procentualna zasićenost vode kiseonikom, pH i koncentracija nitrata ( $NO_3-N$ ) su orijentisane u suprotnom smeru od prethodnih faktora, i vrsta *L. intermedius* je pozitivno sa korelisana ovim faktorima.

U odnosu na drugu kanoniju osu (Slika 46) koja opisuje 30% varijabilnosti (Tabela 14b), uočava se pozitivna korelacija vrste *L. opacus* sa sledećim faktorima: koncentracijom rastvorenog kiseonika (mg/l), zasićenošću vode kiseonikom (%) i temperaturom (°C). Parametri pH, elektropovodljivost i nitrati ( $NO_3-N$ ) su orijentisani u negativnom delu druge ose, i sa njima su pozitivno korelisane vrste *L. intermedius* i *L. volckmari* (Slika 46).

Tabela 15

a) Gradijent uticaja fizičkih i hemijskih parametara na populacije vrsta roda *Elmis* na istraživanim lokalitetima kao rezultat prethodne selekcije

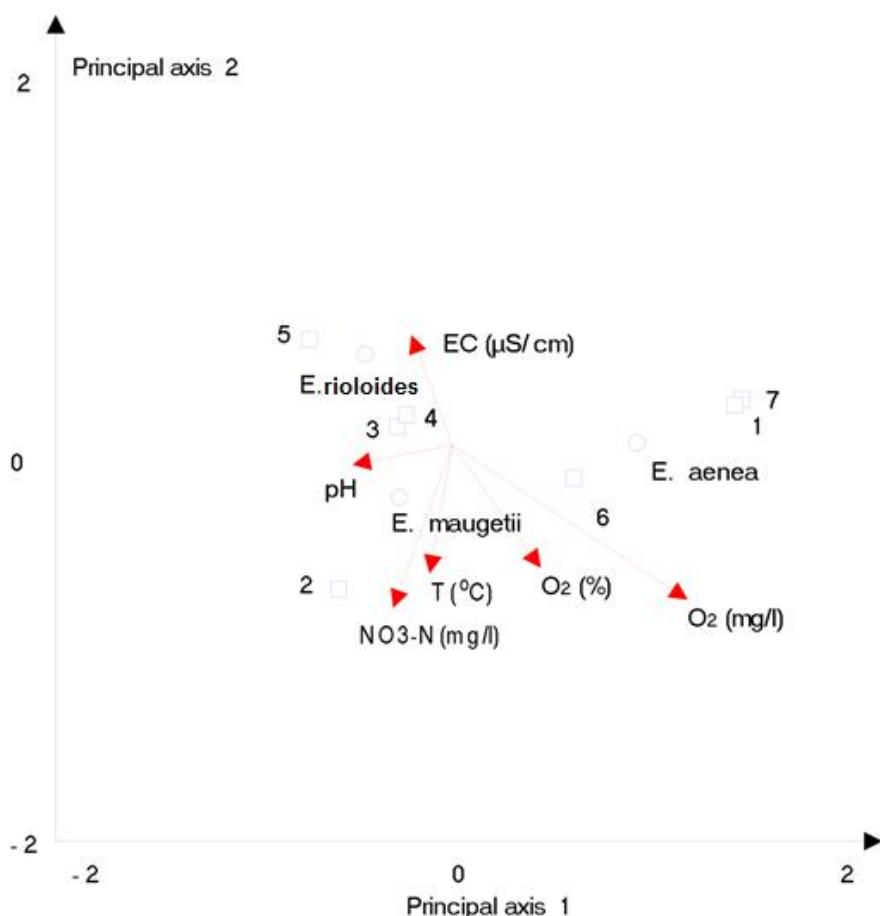
Varijabla	Eigen-vrednost	F statistika	Verovatnoća
Rastvoren O <sub>2</sub> (mgL <sup>-1</sup> )	0,1963	5,041	0,005
Temperatura vode (°C)	0,0474	0,744	0,204
Nitrati (NO <sub>3</sub> -N) (mgL <sup>-1</sup> )	0,1068	1,983	0,152
pH	0,0429	0,665	0,111
Zasićenje vode kiseonikom (%)	0,0276	0,411	0,542
Elektropovodljivost (μS/cm)	0,0089	0,127	0,001

b) Udeo varijabilnosti duž prve dve kanonijске ose – vrste roda *Elmis*

Nefitovana kanonijска оса	Udeo varijabilnosti (%)
1	81
2	19

c) Monte Carlo test

Monte Carlo test	R kvadrat	F koeficijent	Verovatnoća
1000 permutations	0,263	0,128	0,0067



Slika 47. Kanonijska korespondentna analiza (CCA) vrsta roda *Elmis* i sredinskih parametara. Lokaliteti: Srbija (1-Pašna Ravan/Trešnjica, 2-Gornja Trešnjica/Trešnjica, 3-Đakovo/Studenica, 4-Gornjak/Mlava, 5-Plavna/Zamna, 6-Mrtvine/Gaberska Reka); Bosna i Hercegovina (7-Velika Šnjegotina/Šnjegotina, 8-Novi Grad/Sana, 9-Bijelila/Una); Bugarska (10-Kozijata/nizvodno od hidroelektrane „Maluša”, 11-Ezeroto/Sivijak)

Na osnovu kanonijske korespondentne analize (Slika 47), posmatranjem odnosa parametara i vrsta u sredinskim gradijentima, utvrđeno je da postoji odvajanje po vrstama roda *Elmis*, ali i po faktorima. U odnosu na prvu kanonijsku osu uočava se izdvajanje vrste *E. cf. aenea* u pozitivnom delu, odnosno vrsta *E. cf. maugetii* i *E. cf. rioloides* u negativnom delu ose. Monte Carlo permutacionim testom (1000 permutacija) dokazana je statistička značajnost ordinacije kanonijskih osa ( $p \leq 0,05$ ; Tabela 15c). U odnosu na prvu kanonijsku osu koja opisuje 81% varijabilnosti (Tabela 15b), koncentracija rastvorenog kiseonika u vodi ( $O_2$ ) i zasićenost vode kiseonikom (%) orijentisani su u istom smeru, i uočava se pozitivna korelacija ovih faktora sa vrstom *Elmis cf. aenea* (Slika 47).

Vrsta *Elmis cf. aenea* zabeležena je u uslovima supersaturacije (i do 138% zasićenja kiseonikom; lokalitet Novi Grad/Sana, Federacija Bosne i Hercegovine). Elektroprovodljivost, pH, nitrati ( $NO_3-N$ ) i temperatura su orijentisani u suprotnom smeru od kiseoničnih faktora. Vrsta *Elmis cf. rioloides* je pozitivno korelisana sa elektroprovodljivošću, a vrsta *E. maugetii* sa pH, koncentracijom nitrata ( $NO_3-N$ ) i temperaturom (Slika 47).

U odnosu na drugu kanonijsku osu (Slika 47), koja opisuje 19% varijabilnosti (Tabela 15b), jedino je elektroprovodljivost orijentisana u pozitivnom delu, i uočava se pozitivna korelacija ovog faktora sa vrstom *E. rioloides*. Ostali faktori [pH, nitrati ( $NO_3-N$ ), zasićenost kiseonikom (%)] su orijentisani u negativnom delu druge kanonijske ose, i sa njima je pozitivno korelisana vrsta *E. cf. maugetii*, dok je vrsta *E. cf. aenea* indiferentna (Slika 47).

#### **4.4. Filogenetska analiza taksona familije Elmidae područja Balkanskog poluostrva**

##### **4.4.1. Barkodiranje taksona**

Rezultati barkodiranja taksona familije Elmidae sa područja Balkanskog poluostrva (obuhvaćeno je 13 lokaliteta iz 5 zemalja: Srbija, Hrvatska, Bugarska, Severna Makedonija i Grčka) prikazani su u Tabeli 16. Ukupno je sekvencirano 19 jedinki u okviru 6 vrsta: *Elmis maugetii* Latreille, 1802, *Riolus cupreus* (Müller, 1806), *Normandia nitens* (Müller, 1817), *Oulimnius tuberculatus* (Müller, 1806), *Limnius*

*intermedius* Fairmaire, 1881 i *Limnius volckmari* (Panzer, 1793), a tri klastera su determinisana do taksonomske kategorije roda (*Stenelmis* sp., *Elmis* spp.). Takođe, u sklopu barkodiranja sproveden je upis svih jedinki sa područja Balkanskog poluostrva sa pratećim podacima u BOLD bazu gena. Podaci o barkodiranim jedinkama elmida ove studije dostupni su na linku [dx.doi.org/10.5883/DS-ELMBNOV](https://dx.doi.org/10.5883/DS-ELMBNOV).

Tabela 16. Barkodirani taksoni familije Elmidae sa područja Balkanskog poluostrva

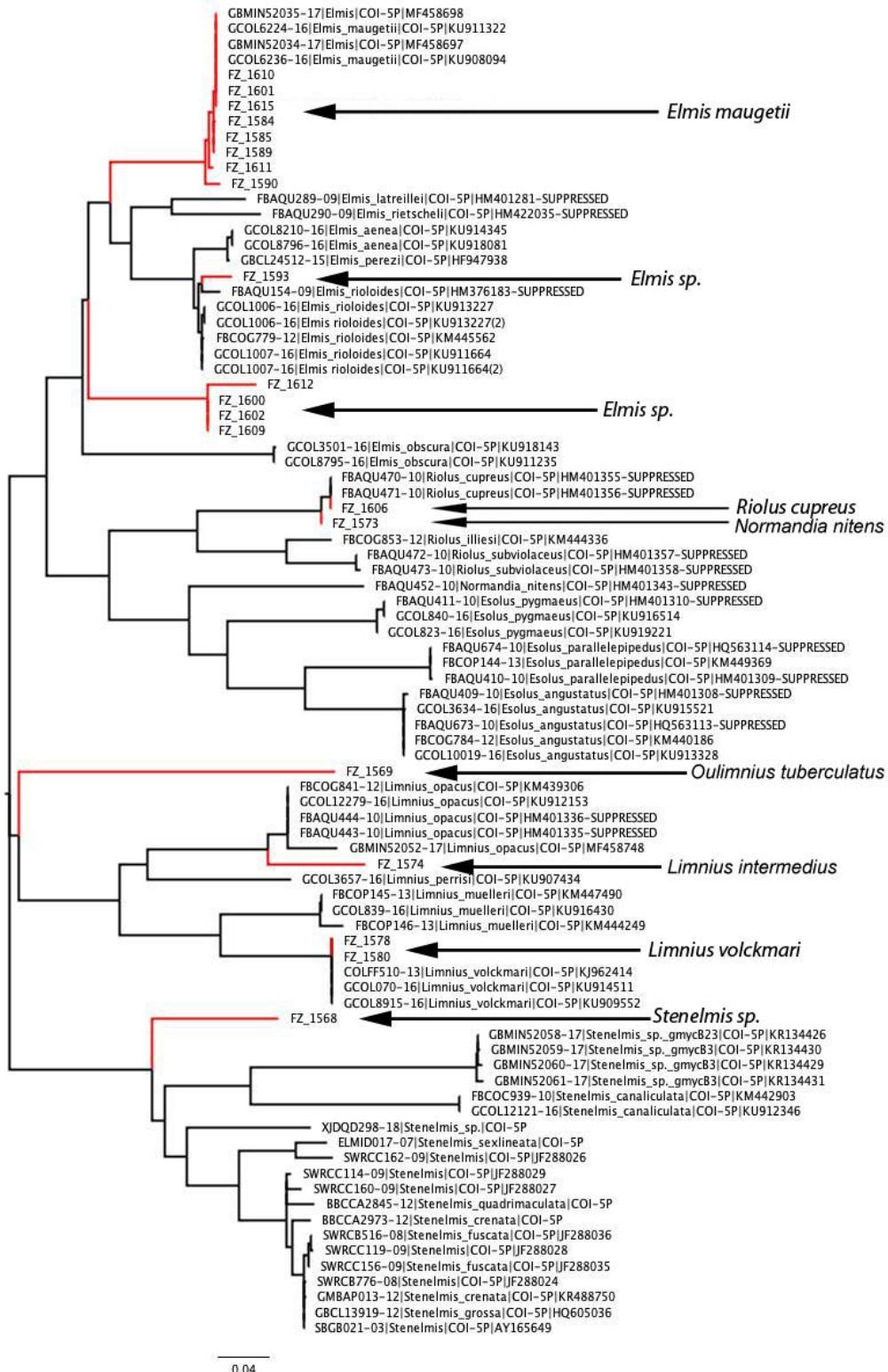
Kod DNK uzorka	BOLD ID	Stadijum jedinke*	Godina sakupljanja	Država**	Kod lokaliteta	Takson
FZ1568	ELMEU090-18	LA	2017	BG	YA1	<i>Stenelmis</i> sp.
FZ1569	ELMEU091-18	LA	2016	RS	MI	<i>Oulimnius tuberculatus</i>
FZ1573	ELMEU092-18	IM	2017	RS	MR2	<i>Normandia nitens</i>
FZ1574	ELMEU093-18	IM	2017	RS	PR	<i>Limnius intermedius</i>
FZ1578	ELMEU094-18	IM	2017	SM	MK	<i>Limnius volckmari</i>
FZ1580	ELMEU095-18	LA	2014	RS	KD	<i>Limnius volckmari</i>
FZ1584	ELMEU096-18	IM	2015	RS	KR	<i>Elmis maugetii</i>
FZ1585	ELMEU097-18	IM	2015	RS	KR	<i>Elmis maugetii</i>
FZ1589	ELMEU098-18	LA	2016	RS	NV	<i>Elmis maugetii</i>
FZ1590	ELMEU099-18	LA	2016	RS	NV	<i>Elmis maugetii</i>
FZ1593	ELMEU100-18	IM	2017	RS	PO	<i>Elmis</i> sp.
FZ1600	ELMEU101-18	IM	2017	RS	MR3	<i>Elmis</i> sp.
FZ1601	ELMEU102-18	IM	2017	GR	ZG2	<i>Elmis maugetii</i>
FZ1602	ELMEU103-18	IM	2017	BG	YA2	<i>Elmis</i> sp.
FZ1606	ELMEU104-18	IM	2017	RS	MR2	<i>Riolus cupreus</i>
FZ1609	ELMEU105-18	IM	2016	HR	OR	<i>Elmis</i> sp.
FZ1610	ELMEU106-18	IM	2016	HR	OR	<i>Elmis maugetii</i>
FZ1611	ELMEU107-18	IM	2015	RS	JR	<i>Elmis maugetii</i>
FZ1615	ELMEU109-18	IM	2017	GR	ZG1	<i>Elmis maugetii</i>

Napomena: \* LA - larva, IM - imago, \*\* RS - Srbija, HR - Hrvatska, SM - Severna Makedonija, BG - Bugarska, GR - Grčka

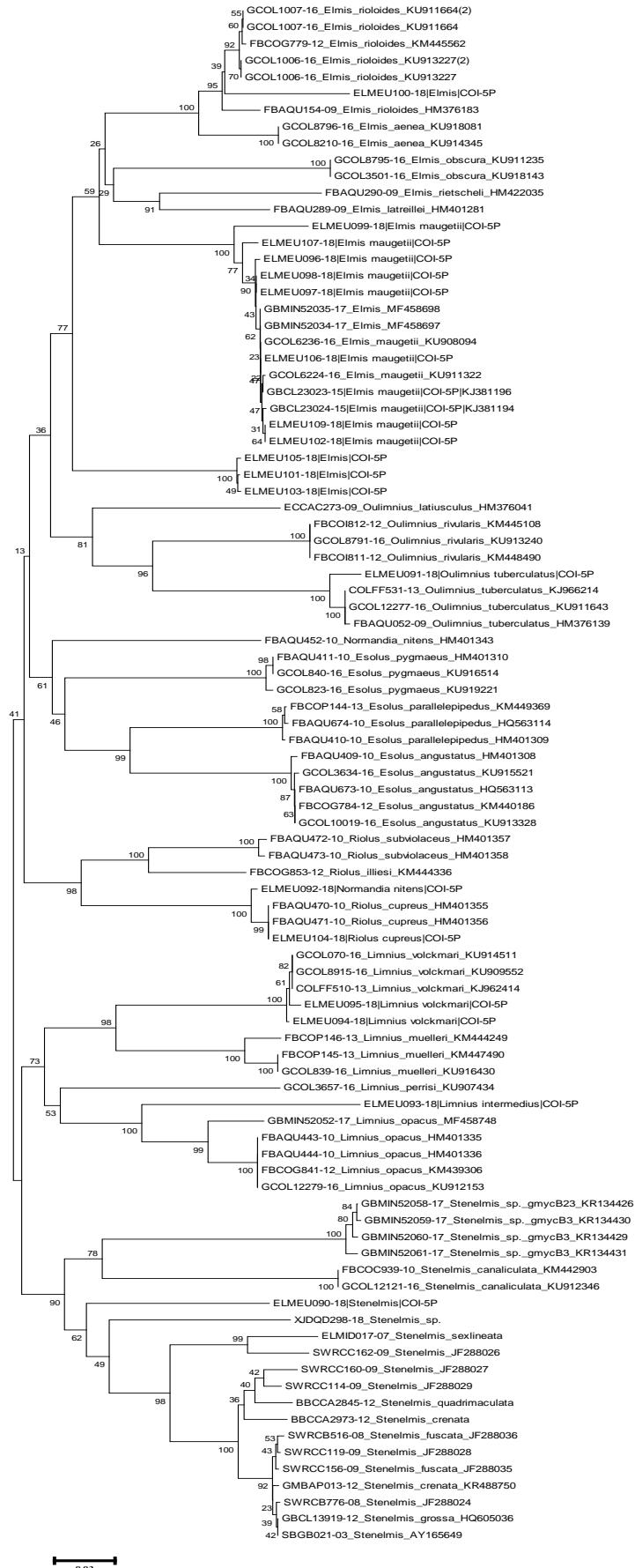
#### **4.4.2. Filogenetska stabla**

Za sekvencirane jedinke različitih vrsta elmida konstruisana su dva tipa filogenetskih stabala: neukorenjeno stablo, metoda maksimalne verovatnoće, *Maximum-Likelihood* (Slika 48) i *Neighbor-Joining* stablo sa K2P distancama (Slika 49). Podaci o jedinkama koje su korišćene za konstrukciju filogenetskih stabala dati su u Tabeli 1 u Prilogu 2.

Topologija ML (*Maximum-Likelihood*) i NJ (*Neighbor-Joining*) stabala je u najvećem delu podudarna. U NJ filogenetskom stablu pojedini uzorci su svrstani shodno pripadnosti pojedinim vrstama, a podrška za grane koje definišu vrste je visoka (uglavnom iznad 90% u NJ analizi, Slika 49). Vrste su u NJ stablu svrstane prema odgovarajućim rodovima u grupe sa umerenom do visokom podrškom (Slika 49).



Slika 48. Neukorenjeno stablo, metoda maksimalne verovatnoće (*Maximum-Likelihood*) dobijeno analizom COI gena. Sekvencirani taksoni ove studije prikazani su kao kodovi DNK uzoraka (videti Tabelu 16). Taksoni iz BOLD i NCBI obeleženi su odgovarajućim oznakama iz genetičkih baza. Dužina grana srazmerna je broju supstitucionih promena (skala označava 0.04 supstitucije).



Slika 49. Neighbor-Joining (NJ) stablo dobijeno analizom COI gena. Sekvencirani taksoni ove studije prikazani su kao BOLD ID (videti Tabelu 16). Taksoni iz BOLD i NCBI obeleženi su odgovarajućim oznakama iz genetičkih baza; aLRT-SH-like podrška je prikazana u nivou grananja. Dužina grana srazmerna je broju supstitucionih promena (skala označava 0.02 supstitucije).

#### **4.4.3. Filogenetski odnosi sekvenciranih i taksona iz genetičkih baza**

Na osnovu upotrebljenog mitohondrijalnog gena za COI, na temelju ML i NJ filogenetskih stabala, komentarisani su filogenetski odnosi između ispitivanih taksona.

Rezultati BOLD identifikacije sekvenci analiziranih taksona su u skladu sa morfološkom identifikacijom taksona. Za nedeterminisane i neidentifikovane uzorke nije bilo moguće izvršiti preciznu identifikaciju, jer ne postoje sekvence u BOLD bazi koje bi odgovarale tim vrstama. Poravnanje je nakon uređivanja bilo dužine 658 nukleotida (broj parsimonijski informativnih pozicija: 247; broj varijabilnih pozicija: 259). Izračunate vrednosti K2P genetičkih distanci između taksona prikazane su u Tabeli 17, a unutar taksona u Tabeli 18. Genetička udaljenost (K2P) unutar vrsta se kreće od 0 (kod vrsta *Stenelmis canaliculata*, *Oulimnius rivularis*, *Elmis aenea* i *E. obscura*) do 0,019 (kod vrste *Elmis rioloides*), i 0,019 (za grupu uzorka iz roda *Stenelmis* JF288027-AY165649 iz NCBI banke nukleotida), a to je još uvek unutar „normalnih“ unutarvrsnih vrednosti (Tabela 18). Važno bi bilo napomenuti da postoji jasan “*barcoding gap*” koji potvrđuje da su vrste dobro genetički odvojene – manje su genetičke distance unutar vrsta (Tabela 18) nego između vrsta (Tabela 17).

Tabela 17. K2P distance između taksona elmida koji su korišćeni u konstrukciji filogenetskih stabala

Tabela 18. K2P distance unutar taksona elmida koji su korišćeni u konstrukciji filogenetskih stabala

<i>Stenelmis</i> JF288027-AY165649	0.019488677
<i>Stenelmis sexlineata</i>	n/c
<i>Stenelmis</i> JF288026	n/c
<i>Stenelmis</i> ELMEU090-18	n/c
<i>Stenelmis</i> sp. XJDQD298-18	n/c
<i>Stenelmis canaliculata</i>	0
<i>Stenelmis</i> sp. gmycB23	0.005351108
<i>Oulimnius tuberculatus</i>	0.008455999
<i>Oulimnius rivularis</i>	0
<i>Oulimnius latiusculus</i>	n/c
<i>Elmis rioloides</i>	0.01945189
<i>Elmis aenea</i>	0
<i>Elmis latreillei</i>	n/c
<i>Elmis rietscheli</i>	n/c
<i>Elmis maugetii</i>	0.007681464
<i>Elmis</i> sp. EMEU 101/103/105-18	0.002030977
<i>Elmis obscura</i>	0
<i>Riolus cupreus + Normandia nitens</i> ELMEU092-18	0.003828559
<i>Riolus subviolaceus</i>	0.004580185
<i>Riolus illiesi</i>	n/c
<i>Esolus angustatus</i>	0.001828578
<i>Esolus parallelepipedus</i>	0.002030977
<i>Esolus pygmaeus</i>	0.003053456
<i>Normandia nitens</i>	n/c
<i>Limnius volckmari</i>	0.002472591
<i>Limnius muelleri</i>	0.015531915
<i>Limnius opacus</i>	0.014341377
<i>Limnius perrisi</i>	n/c
<i>Limnius intermedius</i>	n/c

Sekvenca identifikovana do klastera *Elmis* sp. sa lokaliteta Poganovo/Jerma (Srbija), FZ\_1593 je, u poređenju sa ostalim sekvencama iz baza, najsličnija sekvenci *Elmis rioloides* FBAQU154-09\_HM376183 iz Bavarske (Nemačka). Morfološkom identifikacijom jedinki sa ovog lokaliteta potvrđeno je da se radi o vrsti *E. rioloides*.

Ukupno je sekvencirano osam jedinki vrste *E. maugetii* iz tri države Balkana: Srbija, Hrvatska i Grčka. Genetička varijabilnost i filogeografija ove vrste je kasnije detaljno opisana (Poglavlje 4.5).

Tri sekvencirane adultne jedinke identifikovane do klastera *Elmis* sp. (FZ\_1600, FZ\_1602, FZ\_1609) filogenetski su jako distancirane od ostalih vrsta roda *Elmis* koje postoje u bazama nukleotida. Identifikacijom ovih jedinki na osnovu morfoloških karaktera *aeodoeagus*-a, ustanovljeno je da se radi o vrsti *Elmis syriaca zoufalli* (Reiter, 1910).

Sekvencirana jedinka larve ELMEU091-18 vrste *Oulimnius tuberculatus*, sa lokaliteta Mihajlovac/Zamna (Srbija), neposredno pre zone uspora i ušća reke Zamne u Dunav, najsličnija je adultnoj jedinki FBAQU052-09\_HM376139 iz BOLD baze koja potiče iz Bavarske (Nemačka), a neznatno je distancirana od adultne jedinke GCOL12277-16\_KU911643 iz Severne Rajne-Vestfalije (Nemačka) i adultne jedinke COLFF531-13\_KJ966214 koja potiče iz Finske (regija Kuusamoensis), što je prikazano u NJ stablu (Slika 48).

Sekvenca vrste *Riolus cupreus* FZ\_1606 potpuno je identična sa dve sekvene jedinki ove vrste (FBAQU470-10\_HM401355 i FBAQU471-10\_HM401356) iz BOLD baze koje potiču iz Bavarske (Nemačka).

Analizirana sekvenca imaga vrste *Normandia nitens*, FZ\_1573 sa lokaliteta Mrtvine/Gaberska Reka (Srbija) filogenetski je bliska pomenutim jedinkama vrste *Riolus cupreus* iz Bavarske. Morfološki, ove dve vrste su veoma slične. Međutim, prema oba filogenetska stabla (Slike 48 i 49), sekvencirana jedinka FBAQU452-10\_HM401343 vrste *Normandia nitens* iz Bavarske (Nemačka), filogenetski je najbliža sekvencama vrste *Esolus pygmaeus* (Müller, 1806), kao i sekvencama drugih vrsta ovog roda - *E. parallelepipedus* (Müller, 1806) i *E. angustatus* (Müller, 1821), što ukazuje na filogenetsku bliskost rodova *Normandia* i *Esolus*. Prema poslednjem katalogu elmida (Jäch i sar., 2016) naziv vrste je *Riolus nitens* (Müller, 1817).

Sekvencirana larva identifikovana do klastera *Stenelmis* sp. sa Studene Reke iz Bugarske, FZ\_1568, znatno je distancirana od ostalih vrsta iz roda *Stenelmis* koje postoje u bazama nukleotida, a zanimljivo je da je filogenetski najsličnija sa jedinkom *Stenelmis* sp. XJDQ298-18 iz BOLD baze iz Kine (Xinjiang Uygur Zizhiqu, Altaj).

Identifikacijom larvalne jedinke na osnovu morfoloških karaktera, a i ostalih larvalnih jedinki taksona *Stenelmis* sp. sa ovog lokaliteta, utvrđeno je da se radi o vrsti *Stenelmis puberula* Reitter, 1887, koja je nova vrsta u entomofauni Bugarske (Novaković i sar., 2020a).

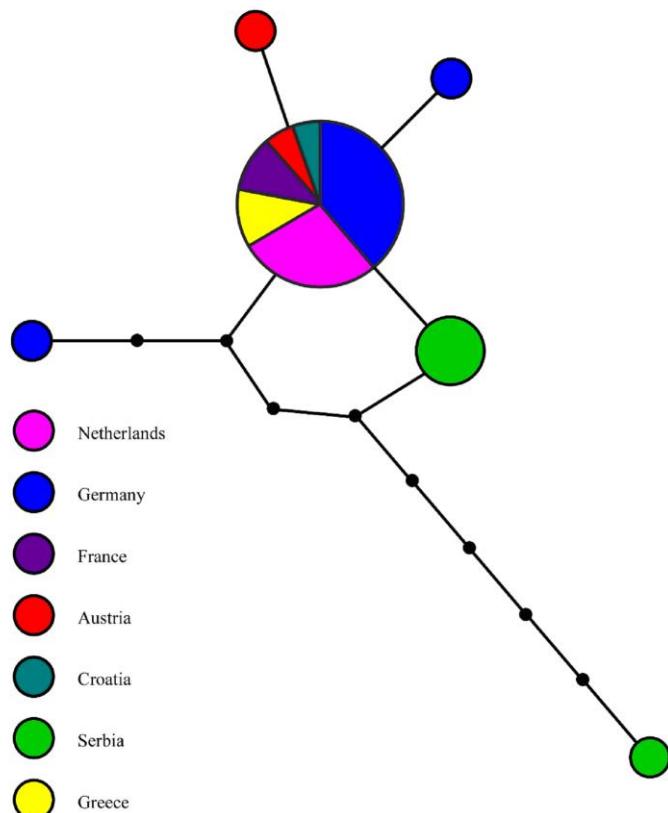
Sekvencirana adultna jedinka *Limnius intermedius* FZ\_1574, koja potiče iz planinskog dela zapadne Srbije (Pašna Ravan/Trešnjica), filogenetski je bliska jedinki GBMIN52052-17\_MF458748 vrste *Limnius opacus* iz NCBI baze koja potiče sa reke Ardeh u Francuskoj. Inače, postoji jako mali broj sekvenci vrste *Limnius intermedius* u bazama nukleotida.

Sekvencirana adultna jedinka vrste *Limnius volckmari*, FZ\_1578, sa lokaliteta Gabrovo, Makedonski Kolešinski Vodopadi/Strumica (Severna Makedonija), i larvalna jedinki FZ\_1580 ove vrste, sa lokaliteta Krivi Dol/Visočica koji se nalazi na obroncima Stare Planine (Srbija) su prema ML stablu potpuno identične, dok se prema NJ stablu filogenetski neznatno razlikuju. Obe jedinke su po sekvcencama filogenetski bliske sa nekoliko adultnih jedinki iz BOLD baze, i to sa jedinkom COLFF510-13\_KJ962414 koja potiče iz Finske (regija Kuusamoensis), jedinkom GCOL070-16\_KU914511 iz Nemačke (Alternar, Berg), kao i jedinkom GCOL8915-16\_KU909552 iz Francuske (Brene).

#### **4.5. Genetička varijabilnost vrste *Elmis maugetii* Latreille, 1802 u Evropi i severnoj Africi**

Procena stepena intraspecijske genetičke varijabilnosti u Evropi i severnoj Africi vrste *Elmis maugetii* urađena je u odnosu na novosekvencirane jedinke vrste, kao i u odnosu na sve jedinke koje postoje u BOLD i NCBI bazama nukleotida. Takođe, prikazani su i populaciono-genetički parametri vrste, njena filogeografska struktura, kao i mogući koridori rekolonizacije evropskog kontinenta u pleistocenu. Kada je reč o populaciono-genetičkim analizama vrste *E. maugetii*, prvi set podataka sastavljen od 25 sekvenci (videti Tabelu 2 u Prilogu 2) otkrio je šest različitih COI haplotipova (557 bp) sa dva parsimonijski informativna mesta, rasprostranjenih u sedam zemalja (Holandija, Francuska, Nemačka, Austrija, Hrvatska, Srbija i Grčka). Filogenetska TCS mreža (Slika 50) ukazuje na „slabu“ filogeografsku strukturiranost među različitim haplotipovima. Najudaljeniji haplotip postoji u populaciji iz Srbije, dok je uobičajeni haplotip bio zastupljen u svim populacijama, osim u populaciji iz Srbije. U TCS mreži, veličina krugova predstavlja relativnu frekvenciju datih haplotipova, dok svaka linija

između čvorova (crni čvorovi - neotkriveni haplotipovi) označava pojedinačni mutacioni korak.



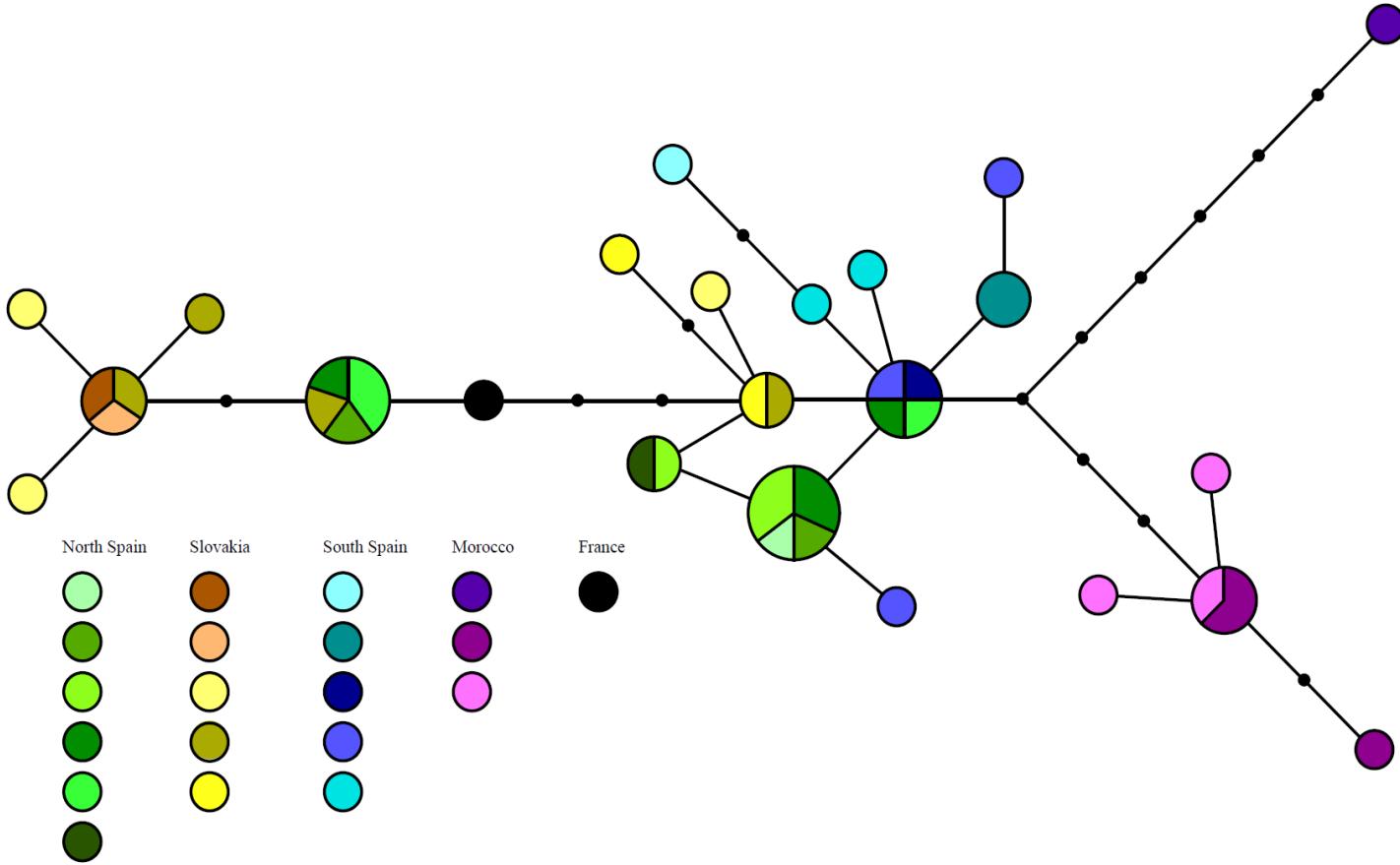
Slika 50. TCS mreža, sa šest COI haplotipova (557 bp) vrste *Elmis maugetii*

Parametri genetičke raznovrsnosti unutar populacije (koristeći dati fragment barkodiranja) razlikovali su se među populacijama (Tabela 19). Diverzitet haplotipova, nukleotidni diverzitet i  $\theta$  - (po mestu) iz  $\eta$ , bili su značajno veći u južnoj populacionoj grupi nego u severnoj. Za obe grupe populacione grupe, Tajima D vrednosti bile su negativne, a ove vrednosti bile su značajne u slučaju severne populacione grupe (-2,034), dok za južnu populacionu grupu nisu bile značajne (-1,035).

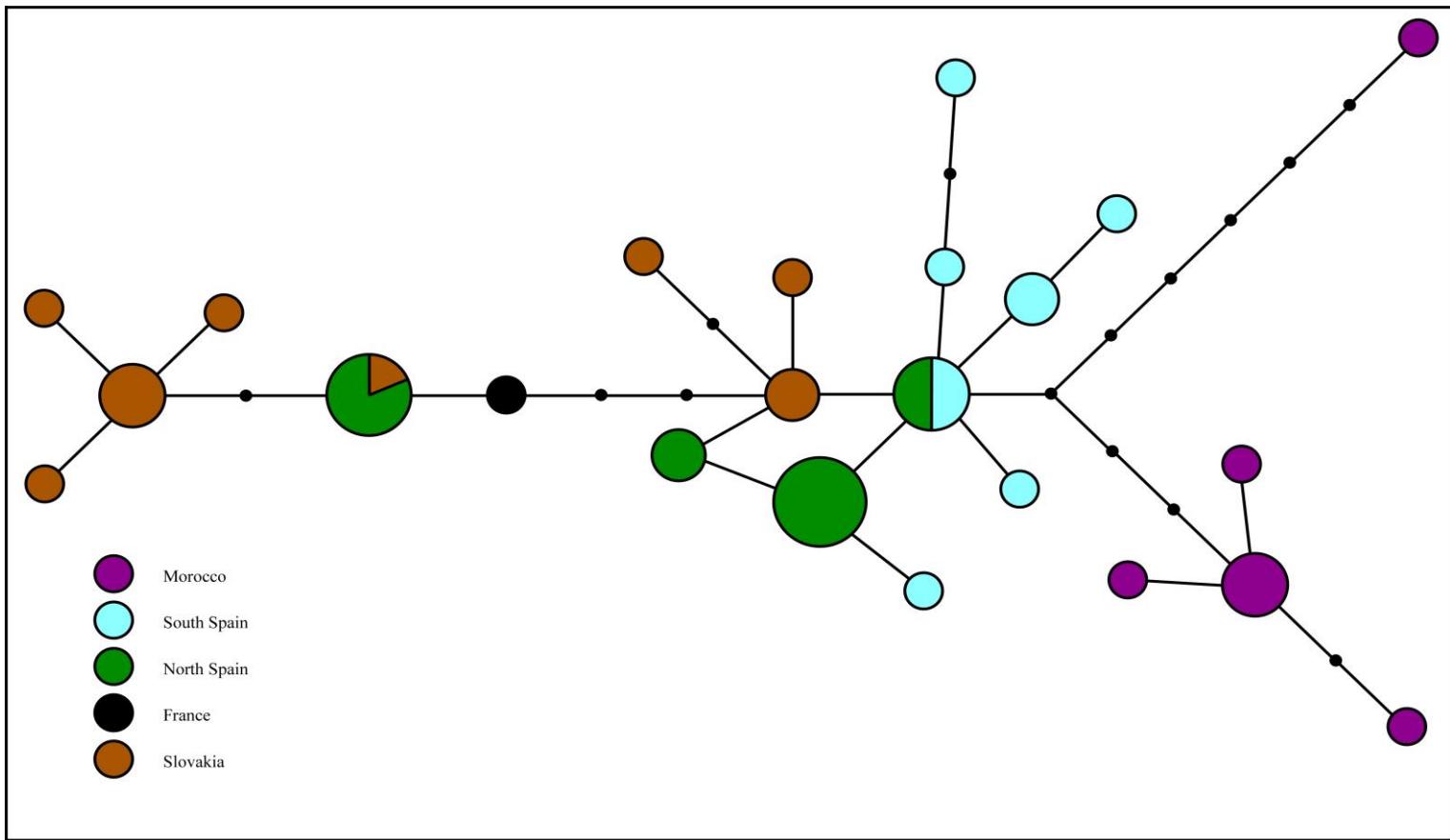
Tabela 19. Indeksi genetičkog diverziteta kod različitih populacija vrste *Elmis maugetii* zasnovani na barkodiranju dela gena COI (557 bp). Skraćenice: N - veličina uzorka, H - broj haplotipova, Hd - diverzitet haplotipova,  $\Pi$  - nukleotidni diverzitet,  $\theta$  - (po mestu) iz  $\eta$  i Tajima D test. Značajne vrednosti Tajima D testa su boldovane.

Populaciona grupa	N	H	Hd	$\Pi$	$\theta$	Tajima's D
južna	7	3	0,714	0,0041	0,00513	-1,03541
severna	18	4	0,314	0,0012	0,00313	<b>-2,0342</b>

Drugi set podataka (822 bazna para 3' COI regionala) dao je 23 haplotipa sa 15 parsimonijskih informativnih mesta. Podaci za konstrukciju TCS mreža korišćeni su iz studije Múrria i sar. (2017) - Tabela 3 u Prilogu 2. TCS mreža po lokalitetima (Slika 51) i TCS mreža po regijama (Slika 52) ukazale su na umerenu filogeografsku strukturu među različitim haplotipovima, sa određenom segregacijom među različitim populacijama (severna Španija i Slovačka, kao i južna Španija i Maroko). Ove populacije imaju sličnu genetičku strukturu, sa neznatnim razlikama u baznim parovima. Pripadnici populacije iz Maroka poseduju privatne haplotipove, koji se ne nalaze u drugim (evropskim) populacijama. Inače, postoje haplotipovi koji dele populacije iz severne i južne Španije i Slovačke. Postoje i određeni privatni haplotipovi koji odgovaraju ovim geografskim oblastima (Múrria i sar., 2017).



Slika 51. TCS mreža od 23 COI haplotipa, 822-bp 3' deo COI vrste *Elmis maugetii* po lokalitetima (geografske koordinate lokaliteta su date u Tabeli 3 u Prilogu 2)



Slika 52.TCS mreža od 23 COI haplotipa,822-bp 3' deo COI vrste *Elmis maugetii* po regijama (regije/države su date u Tabeli 3 u Prilogu 2)

U drugom setu podataka, indeksi genetičkog diverziteta unutar populacija razlikovali su se među populacijama (Tabela 20). Diverzitet haplotipova najmanji je u Maroku (0,857), nešto veći u Španiji (0,896), a najviši u Slovačkoj (0,939). Nukleotidni diverzitet najmanji je u Španiji (0,0036), nešto veći u Maroku (0,0045), a najviši u Slovačkoj (0,0050).  $\theta$  - (po mestu) iz  $\eta$  vrednost bila je najniža u Španiji (0,0043), nešto veća u Slovačkoj (0,0048), a najveća u Maroku (0,0065). Tajima D vrednosti bile su negativne za populacije iz Maroka i Španije, a pozitivne za populaciju u Slovačkoj. Osim toga, populacija iz Maroka imala je statistički značajne Tajima D vrednosti (-1,643), dok ostale dve populacione grupe nisu imale statistički značajne Tajima D vrednosti.

Tabela 20. Parametri genetičkog diverziteta kod različitih populacija vrste *Elmis maugetii* zasnovani na 3' delu COI gena (822 bp). Skraćenice: N - veličina uzorka, H - broj haplotipova, Hd - diverzitet haplotipova,  $\Pi$  - nukleotidni diverzitet,  $\theta$  - (po mestu) iz  $\eta$  i Tajima D test. Značajne vrednosti Tajima D testa su boldovane.

Populacija	N	H	Hd	$\Pi$	$\theta$	Tajima's D
Maroko	7	5	0,857	0,00452	0,00646	<b>-1,64292</b>
Španija	23	10	0,896	0,00358	0,00428	-0,57856
srednja i zapadna Evropa (Slovačka i Francuska)	12	9	0,939	0,00496	0,00483	0,10792

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Morfometrijska analiza odabralih vrsta familije Elmidae Balkanskog poluostrva

Analizirane vrste iz familije Elmidae u okviru rodova, *Limnius* (*Limnius intermedius*, *L. volckmari* i *L. opacus*) i *Elmis* (*E. cf. aenea*, *E. cf. maugetii* i *E. cf. rioloides*) na području Balkanskog poluostrva, pokazuju veliki stepen intra- i interpopulacione varijabilnosti analiziranih morfometrijskih karaktera, što je dokazano primenom PCA i SOM analiza.

Analizom glavnih komponenti (PCA) utvrđeno je da je kod roda *Limnius* razdvajanje unutar roda (i vrsta i populacija) izraženije i sama PCA je informativnija, odnosno prve tri ose opisuju skoro dva puta više ukupne varijabilnosti nego što je to slučaj kod roda *Elmis*, čime je značaj izdvojenih morfoloških karaktera u slučaju roda *Limnius* veći. Razdvajanje vrsta roda *Elmis* na osnovu morfoloških karaktera i specifičnosti struktura pronotuma, koje najčešće mogu biti relevantni taksonomski karakteri za identifikaciju pojedinih vrsta ovog roda, potvrđeno je u ranijim istraživanjima (Lompe, 2014; Alonso i d'Alys, 2018).

Primenom diskriminantne analize (DA) dodatno je potvrđeno razdvajanje analiziranih vrsta elmida na osnovu morfometrijskih karaktera. Korišćenjem DA potvrđeno je razdvajanje vrsta rodova *Limnius* i *Elmis* u odnosu na ukupnu dužinu tela (UD), koja može biti jedan od relevantnih taksonomskih karaktera za identifikaciju taksona, što je u skladu sa literurnim izvorima (Friday, 1988; Nilsson, 1996; Lompe, 2014; Alonso i d'Alys, 2018). Do preklapanja u dužini tela dolazi kod vrsta *Limnius volckmari* i *L. intermedius*, kao i kod vrsta *Elmis cf. aenea* i *E. cf. maugetii*, dok su vrste *L. opacus* i *E. cf. rioloides* sitnije od svojih kongeneričnih predstavnika. Jedino kod vrste *Limnius intermedius*, sa lokaliteta Velika Šnjegotina/Šnjegotina, Republika Srpska, zabeležene su nešto krupnije jedinke u odnosu na literurne izvore (Friday, 1988; Nilsson, 1996; Lompe, 2014; Alonso i d'Alys, 2018), što može biti posledica dugotrajnog stajanja jedinki u etanolu. Poznato je da alkohol može uticati na elongaciju organizama (Friday, 1988), ali nije isključen i uticaj sredinskih faktora na dužinu

organizama. Svakako, potrebna su dalja detaljnija morfološka istraživanja, sa većim brojem uzoraka, kao i na većem geografskom području.

Lokaliteti koji su međusobno najsličniji po izmerenim fizičkim i hemijskim parametrima su: Pašna Ravan/Trešnjica, Đakovo/Studenica, Gornjak/Mlava (Srbija), Bijelila/Una (Bosna i Hercegovina) i Kozijata/nizvodno od hidroelektrane „Maluša”. Sličnost fizičkih i hemijskih parametara mogla bi se objasniti sličnošću tipologije navedenih vodotoka, kao i njihovom pozicioniranošću pretežno u brdsko-planinskim regijama Balkana. Sličnost izmerenih fizičkih i hemijskih parametara se ne odražava na analizirane morfometrijske karaktere, osim kod karaktera dužina tela (UD) koji ukazuje na znatno manju intrapopulacionu varijabilnost u slučaju svih vrsta roda *Elmis* na pomenutim lokalitetima. Kod svih vrsta roda *Limnius*, intrapopulaciona varijabilnost u odnosu na morfometrijski karakter UD je veća, i pored sličnosti lokaliteta po izmerenim fizičkim i hemijskim parametrima, što bi se moglo objasniti time da analizirane vrste roda *Limnius* imaju veći opseg varijabilnosti dužine tela, nego analizirane vrste roda *Elmis* (Lompe, 2014; Alonso i d'Alys, 2018).

## **5.2. Uticaj hidroloških parametara na morfometrijske karaktere**

Poznato je da kretanje vode u tekućicama najviše zavisi od hidromorfoloških promena. Kretanje vode u tekućici je zavisno od tri parametra: nagiba korita, propusnosti korita i količine vode (Kerovec, 1988). Takođe hidromorfološke promene mogu modifikovati strukturu mikrostaništa (Živić i Marković, 2017). Hidromorfološka degradacija i devastacija autohtonih i permanentnih mikrostaništa, bitnih kao utočišta za vrste elmida, a posebno za one vrste ograničene na gornje tokove reka sa specifičnim fizičko-hemijskim i hidrološkim uslovima (zona pastrmke), dovodi do povlačenja vrsta iz hidromorfološki izmenjenih mikrostaništa. Varijacije u hidrauličkom pritisku, naročito trenutni proticaj, može poremetiti faunu, odnošenjem ili ubijanjem organizama (Townsend i Hildrew, 1994). Ekstremne vremenske prilike takođe mogu da utiču na privremenu promenu mikrostaništa vrste *Elmis maugetii*: insekti se povlače u dobro aerisane poteze vodotokova, što je u ovoj studiji dokazano merenjem zasićenja vode kiseonikom.

Početna hipoteza da hidraulički pritisak vode utiče na veličinu jedinki je potvrđena. Konstatovano je da postoji pozitivna korelacija između porasta gradijenta proticaja i veličine organizama. S obzirom da ne postoji mnogo literaturnih izvora na temu hidrološkog uticaja na morfometriju vrsta podfamilije Elminae, potrebno je sprovesti detaljnija istraživanja. U ovom istraživanju predstavljeni su preliminarni rezultati, koji su diskutovani u odnosu i na druge grupe akvatičnih bentosnih invertebrata. Kod vrste *Elmis maugetii* krupniji adulti nalaženi su u uslovima većeg protoka vode, što je dobijeno i u studiji Mérigoux i Dolédec (2004) u potocima južne Francuske. Krupnije jedinke najzastupljenijih grupa bentosnih invertebrata (Trichoptera, Coleoptera, Plecoptera, Ephemeroptera i dr.) nađene su pretežno u uslovima ekstremnog hidrauličkog stresa (Mérigoux i Dolédec, 2004). U ovoj studiji iz Francuske tvrdi se da se morfološke i bihevioralne karakteristike, kao što je sposobnost pričvršćivanja za supstrat, mogu favorizovati srazmerno veličini jedinki, čime se prevazilazi „nedostatak“ krupnije veličine jedinki. Rezultati dobijeni ovim istraživanjem, za vrstu *Elmis maugetii*, su u skladu sa rezultatima studije Mérigoux i Dolédec (2004). Kod vrste *E. maugetii* ustanovljeno je da vodostaj i dubina uzorkovanja nisu značajni faktori za veličinu tela organizama i ostalih analiziranih morfometrijskih karaktera (dužina glave i maksimalna širina protoraksa). Dokazano je da hidraulički stres, pre svega intenzitet proticaja, utiče na morfometrijske karaktere vrste *E. maugetii*, za razliku od vodostaja i dubine uzorkovanja.

S druge strane, suprotni rezultati u odnosu na studiju Mérigoux i Dolédec (2004) i ovu studiju, prikazani su u studiji Segura i sar. (2013), gde su u uslovima intenzivnijeg proticaja izmerene sitnije jedinke larvi elmida. U pomenutoj studiji su istraživani obrasci veličine tela larve vrste *Phanocerus clavicornis* Sharp, 1882 (Elmidae: Larinae) duž gradijenta promene proticaja u Atlantskim prašumama. Efekti takvog poremećaja mogu da variraju u odnosu na veličinu tela svakog organizma: manje jedinke su više u stanju da se odupru vodenoj struji i da ne budu odnesene strujom, i/ili prežive u uslovima koji su povezani sa povećanim proticajem. Njihovi rezultati ukazuju na to da u dužim potocima može postojati ravnoteža između boljeg korišćenja skloništa od strane manjih larvi i veće sposobnosti krupnijih larvi da se ustale na podlozi. Osim toga, pretpostavili su da postoji direktna veza između brzine protoka i sezone: proticaj je sporiji u sušnoj nego u kišnoj sezoni. Nadalje, postavljena je hipoteza da larve *P.*

*clavicornis* imaju različitu veličinu tela kao odgovor na različiti trenutni proticaj u potocima na nižim nadmorskim visinama u Atlantskim prašumama. Naime, u periodu bržeg proticaja (kišna sezona) larve *P. clavicornis* imale bi manje telo nego u periodu sporijeg proticaja (sušna sezona). Ovo bi se moglo objasniti činjenicom da je u pitanju specifično klimatsko područje sa vrlo varijabilnim hidrološkim režimom, a i time da predstavnici podfamilije Larinae kojoj pripada vrsta *P. clavicornis* nemaju plastron (Brown, 1987), za razliku od proučavane vrste (*Elmis maugetii*). Slični rezultati takođe su dokazani u ranjoj studiji jedne reke u Australiji, gde su nakon velike poplave beskičmenjaci bili sitniji (Thomson, 2002). U studiji Townsend i Hildrew (1994) navodi se da u staništima koja su stabilna duže vremena mogu naći vrste sa dužim životnim ciklusom i većim dimenzijama tela. Peters (1983) navodi da kod akvatičnih insekata velika plastičnost veličine tela može biti rezultat fenotipske adaptacije na lokalne uslove.

Na pojedinim mestima uzorkovanja reka i potoka u Srbiji brzina protoka bila je niža, ali je izmerena zasićenost kiseonikom još uvek bila visoka (i do 105% na reci Crnajki; Tabela 2, Poglavlje 3.3.3) što ukazuje da je kiseonik jedan od najvažnijih fizičko-hemijskih parametara za prisustvo elmida u mikrostaništima, što je dokazano i u ranijim istraživanjima (Brocher, 1912; Thorpe i Crisp, 1949; Thorpe, 1950; Brown, 1987; Elliot, 2008a).

Što se tiče tipova mikrostaništa koje naseljavaju elmide, na lokalitetima Tulare/Tularska Reka, Krivi Dol/Visočica i Crnajka/Crnajka dominira mezolital, dok na lokalitetima Trnski Odorovci/Jerma, Mrtvine/Gaberska Reka i Manastir Manasija/Resava dominiraju makro- i mezolital. Visoke vrednosti zasićenja kiseonikom ukazuju da sve istražene vodotokove karakteriše dobra aerisanost (83-105%), a što je bitno za vrstu *Elmis maugetii* koja respiraciju vrši pomoću plastrona (Brown, 1987). Ustanovljeno je da jedinke *E. maugetii* preferiraju poteze vodotoka gde preovlađuju uslovi povećane koncentracije kiseonika, i do supersaturacije (105%, Crnajka), čak i uslovima smanjenog intenziteta proticaja (Tularska Reka i Crnajka), a jedinke su zabeležene i u uslovima nešto više temperature vode (22.4 °C, Crnajka).

Imajući u vidu povezanost vrsta elmida sa dugotrajnim boravkom u uslovima ubrzanog protoka vode, nije isključen ni uticaj podloge različite granulacije, koja

omogućuje čvrsto prijanjanje jedinki da ih ne odnese matica reke, kao i tip-specifičnih mikrostaništa na morfometriju vrsta, za šta je potrebno sprovesti dodatna istraživanja.

### **5.3. Uticaj abiotičkih faktora na populacije odabranih vrsta elmida**

Abiotički faktori mogu imati značajan uticaj na strukturu i dinamiku zajednice akvatičnih tvrdokrilaca (Klečka, 2008). Pojedine vrste naseljavaju više tipova staništa, npr. vrste roda *Elmis* koje su bile dominantne u reokrenim i limnokrenim vrelima potoka i reka danas se mogu naći u širem spektru staništa, u gornjim, srednjim, čak i donjim tokovima reka, što ukazuje da su vremenom postale eurivalentnije i adaptirale se na izmenjene sredinske uslove, povećavajući njihovu toleranciju na relevantne ekološke faktore (Boukal i sar., 2007). Takođe, poznato je da vegetacija vodenim tvdrokrilcima pruža izvor hrane tokom nepovoljnih perioda, a i utočište od predatora (npr. Byttebier i sar., 2012).

Rezultati ove studije pokazuju da, od analiziranih abiotičkih faktora, najveći uticaj na morfometrijsku i ekofenotipsku varijabilnost ispitanih vrsta roda *Limnius* i *Elmis* imaju: temperatura vode i pH vrednost. Elektroprovodljivost, koncentracija rastvorenog kiseonika, procenat zasićenja vode kiseonikom i koncentracija nitrata su imali nešto manji uticaj.

Na osnovu SOM analize i vizuelne korelacije intenziteta morfometrijskih parametara i izmerenih sredinskih faktora, konstatovano je da je najveći broj konzervativnih morfometrijskih parametara vrsta *Limnius volckmari*, *L. opacus*, *Elmis cf. aenea*, *E. cf. maugetii* i *E. cf. rioloides* visoko korelisan sa većim pH vrednostima i višim koncentracijama rastvorenog kiseonika (DO), što je i očekivano, jer su navedene vrste tokom ove studije beležene uglavnom u alkalnim vodama sa većom koncentracijom rastvorenog kiseonika (DO). Za razliku od drugih familija akvatičnih tvdrokrilaca - Dytiscidae, Gyrinidae, Haliplidae i Hydrophilidae, za čiji je sastav zajednice ustanovljeno da nije korelisan sa pH vrednošću (Arnott i sar., 2006), prisustvo vrsta familije Elmidae u vodenim staništima je negativno povezano sa acidifikacijom i zagađenjem vode (Nilsson, 1996).

Kanonijskom korespondentnom analizom (CCA) dokazano je da je najznačajniji faktor koji utiče na vrstu *Limnius intermedius* rastvoren kiseonik ( $O_2$ ), što je potvrđeno

ranijim istraživanjima u kojima se navodi da je kiseonik kao parametar veoma bitan faktor za ovu vrstu, a inače i za vrste iz familije Elmidae (Elliot, 2008a). S druge strane, vrsta *L. intermedius* toleriše visoke koncentracije nitrata ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) u vodi, i do 27 mg/l (lokalitet Ezeroto/Sivjak). Maitland (1967) navodi da nema neposrednog uticaja fizičko-hemijskih parametara vode na vrstu *L. volckmari* i euritopni karakter ove vrste, što nije potvrđeno ovim istraživanjem, kao ni istraživanjem Mičetić Stanković i sar. (2018a), gde se temperatura vode pokazala kao najvažniji faktor koji utiče na njenu distribuciju i brojnost. García-Criado i Fernández-Aláez (1995) navode određeni stepen tolerancije vrste *Limnius opacus* na koncentraciju nitrata ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) u rekama sliva Orbigo u Španiji, kao i na ostale izmerene hemijske parametre vode (alkalitet, hloridi, sulfati, HPK i ukupan fosfor), isto kao i kod vrste *E. maugetii*.

Tokom ovih istraživanja potvrđeno je kao i u radu García-Criado i Fernández-Aláez (1995) da je vrsta *Elmis maugetii* relativno tolerantna na koncentraciju nitrata ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ), i može se naći u uslovima širokog raspona ostalih analiziranih hemijskih parametara (alkalitet, hloridi, sulfati, HPK i ukupan fosfor), čak i u najviše degradiranim tačkama uzorkovanja u slivu reke Orbigo u Španiji, ali preferira mesta gde je zagađenje umereno (García-Criado i Fernández-Aláez, 1995). Upravo takvu relativnu toleranciju vrste *E. maugetii* potvrdili su Puig (1983) i Rico (1992) u Španiji, kao i Grasser (1994) u Austriji.

Kanoniskom korespondentnom analizom (CCA) pokazana je pozitivna korelacija koncentracije rastvorenog kisonika u vodi i procentualnog zasićenja vode kiseonikom sa vrstom *Elmis cf. aenea*, što je u skladu sa literaturnim izvorima (npr. Elliot, 2008a). Vrsta *Elmis cf. aenea* ima nešto veću toleranciju na pH, nitrate ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ), zasićenost kiseonikom i koncentraciju rastvorenog kisonika u vodi, što je potvrđeno i istraživanjama u Hrvatskoj za pH vrednost, gde su na lokalitetu Potok Plitvica zabeležena najveća kolebanja pH vrednosti vode (Mičetić Stanković i sar., 2018a). U Hrvatskoj, u izvorišnim područjima reke Cetine i Plitvičkih jezera, temperatura vode, koja direktno utiče i na ostale fizičko-hemijske parametre (Giller i Malmqvist, 1998), i pH vrednost, kao i njihova najmanja variranja, imale su značajan uticaj na vodene tvrdokrilce (Mičetić Stanković i sar., 2018a, 2019). Zasićenost vode kiseonikom i alkalitet naročito su značajni abiotički faktori i za krenalne vrste *Hydradephaga*,

*Hydroporus tessellatus* (Drapiez, 1819), *H. planus* (Fabricius, 1781), kao i za vrstu *Esolus parallelepipedus* i rod *Elmis* (Mičetić Stanković i sar., 2018a).

Zasićenost vode kiseonikom je ključni parametar u samom staništu i direktno utiče na druge fizičko-hemijske parametre vode, pre svega temperaturu (npr. Giller i Malmqvist, 1998). Sve vrste roda *Limnius* i *Elmis* analizirane u ovoj studiji zabeležene su u alkalnim vodama sa visokom procentualnom zasićenošću vode kiseonikom. Duž reke Cetine u Hrvatskoj, zasićenost kiseonikom i rastvorenim kiseonikom izgleda da limitiraju distribuciju vrste *Elmis aenea* (Mičetić Stanković i sar., 2018a). Naime, prisustvo vrste nije zabeleženo na lokalitetima u srednjem toku reke gde su vrednosti koncentracije kiseonika bile niske (Mičetić Stanković i sar., 2018a). Takođe, poređenjem odnosa druge vrste ovog roda, *Elmis bosnica* Zaitzev, 1908, i fizičko-hemijskih parametara vode na četiri istraživana izvora u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini može se zaključiti da navedena vrsta zaista odražava uslove u staništu (Mičetić Stanković, 2012). Rezultati navedene studije pokazuju da na vrstu najviše utiču pH, alkalitet, elektroprovodljivost, temperatura vode, kao i s njom povezana količina rastvorenog kiseonika u vodi. Takođe, slični su rezultati dobijeni i za ostale elmide: *E. aenea*, *E. rioloides*, kao i za *Riolus cupreus* (Müller, 1806) i *R. subviolaceus* (Müller, 1817) (Mičetić Stanković, 2012).

U ovoj studiji, za vrste *Elmis cf. aenea* i *E. cf. rioloides*, ustanovljeno je da koegzistiraju zajedno na lokalitetima Đakovo/Studenica i Gornjak/Mlava (Srbija), gde izmerene pH vrednosti odgovaraju alkalnim vodama (8,30-Đakovo/Studenica, odnosno 8,10-Gornjak/Mlava). Na oba lokaliteta izmerene su temperature koje odgovaraju letnjem sezonskom aspektu vodotokova (16,4; odnosno 17,3° C), visoke vrednosti koncentracije rastvorenog kiseonika (9,7; odnosno 9,9 mg/l), visoke procentualne zasićenosti vode kiseonikom (99, odnosno 106 %), kao i relativno niske koncentracije nitrata, po 0,4 mg/l na oba lokaliteta (Tabela 1 u Prilogu 1). Na izvorima Plitvičkih jezera i reke Cetine zabeležene su korelacije vrste *Elmis bosnica* sa koncentracijom rastvorenog kiseonika u vodi (Mičetić Stanković, 2012). Isto tako, na izvoru reke Bistrice u Bosni i Hercegovini temperatura vode je imala najvažniju ulogu u sastavu faune te vrste, a i za distribuciju i brojnost vrste *Limnius volckmari* (Mičetić Stanković, 2012). Temperatura vode izvora je u direktnoj vezi sa okolnom temperaturom vazduha; prosečna temperatura vode izvora najčešće jednaka je prosečnoj godišnjoj temperaturi

vazduha područja gde se izvor nalazi (van der Kamp, 1995). Stoga je na kraškim izvorima koji su po prirodi specifičniji u odnosu na reke koje su obuhvaćene ovom studijom, temperatura relevantniji faktor od količine kiseonika u vodi, a takođe izvori su mesta gde izlazi podzemna voda siromašna kiseonikom (Giller i Malmqvist, 1998). Ovom studijom dokazano da je sadržaj kiseonika u vodi relevantniji faktor od temperature, s obzirom na tipologiju obrađenih vodotokova.

Što se tiče morfologije i tipologije mikrostaništa, jedinke vrste *Elmis cf. aenea* i *E. cf. maugetii* uzorkovane su uglavnom u mikrostaništima sa dominacijom makro- i mezolitala, ali ne koegzistiraju zajedno, osim na lokalitetu Novi Grad/Sana, gde od podloga dominiraju mikrolital, akal i psamal, i koji je na nižoj nadmorskoj visini (130 m) u odnosu na ostale lokalitete. Boukal i sar. (2007) navode da je *Elmis aenea* obično vrlo česta vrsta u gornjim tokovima reka (zona hipokrenala i metaritrala), uglavnom u planinama i pobrđu. Može se sresti nizvodnije nego vrsta *Elmis latreillei*, a uzvodnije nego *E. rioloides* i *E. maugetii maugetii*, mada se obično preklapaju. Povremeni nalazi u toplijim nizijskim rekama i velikim rekama mogu se objasniti time da su organizmi odneseni driftom nizvodno, npr. za vreme poplava. Nalazi vrste na lokalitetu Novi/Grad Sana na nižoj nadmorskoj visini verovatno da nisu posledica drifta, već na tom vodotoku postoje odgovarajuća staništa za ovu vrstu. Takođe, vrsta *Elmis aenea* nađena je i u donjem toku reke Cetine u Hrvatskoj, gde je pH vrednost bila vrlo visoka (Mičetić Stanković i sar., 2018a). Eyre i sar. (1993) ustanovili da vrsta *E. aenea* u severnoj Engleskoj, zajedno sa vrstama *Potamonectes elegans* (Panzer, 1794) i *Stictotarsus duodecimpustulatus* (Fabricius, 1792), preferira mesta koja su najudaljenija od izvora reka. Takođe, Eyre i sar. (1993) su zaključili da u severnoj Engleskoj vrsta *E. aenea* preferira alkalne vode i otvoreni tip supstrata (bez makrovegetacije), kao i vrsta *Hydraena gracilis* Germar, 1824. Berthélemy (1964) navodi da su *E. aenea* i *E. rioloides* tipične vrste gornjih tokova reka, ali u ovom istraživanju dobijeni rezultati ukazuju da su obe vrste prisutne i u srednjim i donjim tokovima reka, kao i u studiji Mičetić Stanković i sar. (2018a) gde su obe vrste bile vrlo brojne u donjem toku reke Cetine. Takođe, prethodna selekcija u sklopu CCA kod vrsta oba roda na Balkanu pokazala je, da je najznačajniji faktor koji utiče na populacije elmida koncentracija rastvorenog kiseonika u vodi ( $O_2$ ), što je u skladu sa literurnim izvorima (npr. Elliot, 2008a).

Iako je u ovim istraživanjima razmatran uticaj nadmorske visine na morfometrijsku varijabilnost vrsta, važno bi bilo napomenuti da se nadmorska visina *per se* ne može uzimati kao abiotički faktor, jer je ona u korelaciji sa ostalim parametrima. Naime, nadmorska visina kao orografski faktor zasebno nije nimalo značajna u biološkom smislu, ali promena temperature vazduha, temperature vode ili brzine strujanja vode jesu; ona je samo surogat-vrednost sredinskih faktora u visinskom gradijentu, jer je u autokorelaciji sa već navedenim karakteristikama staništa (Brehm i Fiedler, 2003; Kryštufek i Bužan, 2008).

#### **5.4. Filogenetska analiza taksona familije Elmidae Balkanskog poluostrva**

U filogenetskom pogledu, familija Elmidae je slabo istražena grupa, jer se u banci gena ne nalaze sekvene svih vrsta, te tek predstoji barkodiranje predstavnika familije. Dobijeni podaci o barkodiranju vrsta u ovom istraživanju prvi su za područje centralnog, istočnog i južnog dela Balkanskog poluostrva. Takođe, prilikom samih molekularnih analiza, utvrđena je velika važnost kvaliteta uzorka za DNK analizu, kao i odgovarajuća priprema materijala.

Dobijene vrednosti K2P genetičkih udaljenosti su u okvirima „normalnih“ K2P vrednosti unutar vrsta/rodova/familija akvatičnih tvrdokrilaca. Postoji jasan „*barcode gap*“ koji potvrđuje da su vrste dobro genetički odvojene - manje su distance unutar nego između taksona. Generalno, kod svih sekvenciranih taksona, analizirane jedinke, u odnosu na postojeće u genetičkim bazama, karakteriše mala intraspecijska varijabilnost i nizak stepen divergencije, odnosno niske vrednosti K2P genetičkih distanci, koje se nalaze unutar granica standardne intraspecijske sekvencijalne divergencije za COI kod tvrdokrilaca (Pentinsaari i sar., 2014).

Na osnovu oba konstruisana filogenetska stabla može se zaključiti da su *Elmis rioloides* i *E. aenea* sestrinske vrste, što je potvrđeno i ranijim istraživanjima (Jovović i sar., 2015). U studijama sekvenciranja vrste *Elmis rioloides* sugerira se da se radi o „kompleksu“ vrsta (Hendrich i sar., 2015; Jovović i sar., 2015). Imajući u vidu morfološku sličnost vrsta *E. rioloides* i *E. aenea* iz Srbije, prepostavlja se da bi ove dve vrste mogle biti vikariantne. Unutar vrste *Elmis maugetii*, zanimljivo je grupisanje svih primeraka iz Srbije. Takođe, kod ove vrste na široj geografskoj skali nije ispoljena varijabilnost sekvenci i postoji uniformnost mitohondrijalnog COI fragmenta na širem

području Evrope, što je detaljno opisano u delu koji se odnosi na genetičku varijabilnost vrste *E. maugetii* u Evropi i severnoj Africi (Poglavlje 4.5). Takođe, za vrstu *Elmis syriaca zoufali* ne postoje sekvene ni u jednoj genetičkoj bazi, pa su ovim istraživanjem dobijeni prvi barkodovi ove vrste (status vrste je morfološki potvrđen analizom *aedoeagus-a*).

Dobijeni rezultati ukazuju da je kod vrste *Oulimnius tuberculatus* slabo izražena sekvenčna varijabilnost mtCOI fragmenta na širem području evropskog kontinenta (Finska, Nemačka, Srbija), što je i očekivano jer su korišćeni konzervativni barkoding markeri.

Na filogenetskim stablima jasno se izdvajaju filetičke linije vrsta roda *Stenelmis* Novoga sveta (*S. sexlineata*, *S. quadrimaculata*, *S. crenata*, *S. fuscata* i *S. grossa*), koje su divergirale nezavisno od vrsta Staroga sveta. Za vrstu *Stenelmis puberula* Reitter, 1887 utvrđeno je da je nova vrsta u entomofauni Bugarske (Novaković i sar., 2020a).

Na osnovu dobijenih podataka tokom istraživanja, pretpostavljeno je da bi vrste *Limnius intermedius* i *L. opacus* mogle biti kriptičke na području Balkanskog poluostrva, odnosno morfološki veoma slične, a genetički različite. Takođe, kod vrste *Limnius volckmari* je na široj geografskoj skali (Finska, Nemačka, Francuska, Srbija, Severna Makedonija) uočena uniformnost mtCOI sekvenci larvalnih i adultnih jedinki ove vrste.

## **5.5. Genetička varijabilnost i filogeografija vrste *Elmis maugetii* Latreille, 1802**

Koristeći oba ispitivana fragmenta mtCOI, vrsta *Elmis maugetii* pokazala je „plitku” genetičku strukturu unutar mitohondrijalne DNK, što se smatra retkošću, jer je većina filogeografskih analiza kod različitih vrsta životinja i biljaka otkrila postojanje nekoliko mitohondrijalnih linija u Evropi (Comes i Kadereit, 1998; Hewitt, 1999; Drag i sar., 2018; Drovetski i sar., 2018; Raković i sar., 2019). Za manje pokretne taksonе, poput nekih drugih akvatičnih insekata, čak i u jednom refugijalnom području (Balkansko poluostrvo) postoji nekoliko mitohondrijskih linija, a ovaj obrazac poznat je i kao „refugijum unutar refugijuma”, koji naglašava kompleksnu istoriju ovog refugijalnog regiona (Previšić i sar., 2009). Jedan od mogućih uzroka „plitke” genetičke strukture *E. maugetii* je rekolonizacija severne Evrope iz jednog refugijuma u relativno

kratkom vremenskom periodu. Pretpostavljeno je da je to slučaj sa vrstom *E. maugetii* u Evropi. Međutim, iako je ovo istraživanje pokazalo uniformnu genetičku strukturu unutar ove vrste, mora se istaći činjenica da uzorkovanjem nisu bila pokrivena sva refugijalna područja. Široko rasprostranjen haplotip pronađen je i u grčkoj populaciji. Ali čak i ako su gore pomenute populacije hipotetički različite, i potencijalno predstavljaju nezavisne evolucione linije, ove populacije nisu doprinele genskom pulu srednje i severne Evrope.

*Elmis maugetii* je zapadnopalearktička vrsta, sa dve podvrste (Jäch i sar., 2016). Nominotipska podvrsta, *E. m. maugetii* Latreille, 1802 rasprostranjena je u kontinentalnoj Evropi (osim severne Skandinavije), a takođe i u Jermeniji i Turskoj (Kodada i sar., 2016). Druga podvrsta, *E. m. velutina* Reiche, 1879 rasprostranjena je u Alžiru i Maroku. Do skoro poznata kao podvrsta, *E. m. fossulata* (Kuwert, 1890), rasprostranjena na Korzici (Francuska) i Sardiniji (Italija), nedavno je resistematizovana kao zasebna vrsta, *E. fossulata* (Bruvo Mađarić i sar., u pripremi), što su ranije pretpostavili i Jäch i sar. (2016). Tipski lokalitet nominalne podvrste je Francuska (Jäch i sar., 2016). Horotip nominalne podvrste je evropsko-mediteranski, EUM (Rocchi i Terzani, 2016).

Jedan od glavnih rezultata ove studije jeste otkriće postojanja velike genetičke raznovrsnosti *Elmis maugetii* na Balkanu, kao i manje genetičke raznovrsnosti u srednjoj i severnoj Evropi. Uobičajeni obrazac koji se javlja pri rekolonizaciji srednje i severne Evrope iz južnih refugijuma okarakterisan je većim diverzitetom haplotipova na jugu, sa „proređivanjem” diverziteta haplotipova idući od juga ka severu. Brojne druge vrste pokazuju manju genetičku raznolikost u severnim populacijama koje su se brzo proširile sa Balkana, npr. bukva *Fagus* sp. L. i mrmoljak *Triturus* sp. Rafinesque, 1815 (Hewitt, 1999). Kod ovih taksona, južne populacije pokazuju znatno veći genetički diverzitet nego severne, kod kojih je genetički diverzitet nizak. Takva raznovrsnost na jugu može se smatrati proizvodom ponovljenih velikih klimatskih oscilacija pod čijim su uticajem genomi mogli preživeti samo na južnim planinskim poluostrvima, gde bi se pogodna staništa mogla kontinuirano održati malim promenama područja (Hewitt, 1999). Dakle, severnu Evropu su verovatno naseljavale jedinke sa Balkanskog poluostrva, kao i u slučaju drugih taksona, npr. livadski skakavac *Chorthippus parallelus* (Zetterstedt, 1821) (Hewitt, 2000) ili obični popić *Prunella modularis*.

(Linnaeus, 1758) (Drovetski i sar., 2018). Postojanje velikog broja distinktnih haplotipova vrste *Elmis maugetii* ukazuje na to da se u istraživanim oblastima održavala filogeografska divergencija najmanje tokom poslednjeg glacijalnog perioda. Među mediteranskim poluostrvima, Balkansko poluostrvo postavljeno je kao glavni izvor postglacijalnih ekspanzija, jer su Alpi i Pirineji bili migracione barijere za kretanje vrsta iz drugih evropskih refugijuma ka severu (Hewitt, 2000). Štaviše, Balkan je služio kao „most“ za migraciju vrsta iz Male Azije za vreme pleistocenske glacijacije (Hewitt, 1999), jer su balkanski region Evrope i Mala Azija bili povezani kopnenom vezom tokom poslednje glacijacije (Aksu i sar., 1999; Tzedakis, 2004). Danas je Balkansko poluostrvo takođe „hotspot“ biodiverziteta. Velika biološka raznovrsnost na Balkanskom poluostrvu može se objasniti dugotrajnom postojanošću povoljnih životnih uslova unutar refugijuma koji su omogućili održavanje stabilnih i genetički varijabilnih populacija (Canestrelli i sar., 2010).

Svi dostupni podaci o 822-bp fragmentu 3' kraja mtCOI kod vrste *E. maugetii* iz Evrope otkrili su da je nukleotidni diverzitet najniži u Maroku i Španiji, a najviši u Slovačkoj, što ukazuje na postojanje potencijalnog koridora za ekspanziju vrste, od srednje Evrope do Pirinejskog poluostrva. Za kolonizaciju Pirinejskog poluostrva sa Balkana pronađen je sličan obrazac kod šumske sove *Strix aluco* Linnaeus, 1758 (Brito, 2005). Vrsta *E. maugetii* verovatno je naselila Maroko sa Pirinejskog poluostrva. Najmanja genetička raznovrsnost uzoraka iz Maroka može se pripisati geografskim barijerama (Gibraltarski moreuz, planine Atlas), koje su usporile stopu ekspanzije ove vrste ka jugu. Takođe je moguće da je jednom formirana populacija u Maroku divergirala od kopnene populacije, budući da su svi haplotipovi koji su tamo pronađeni bili privatni (nađeni samo u toj populaciji), a imajući u vidu i da jedino u severnoj Africi (Maroku i Alžиру) živi druga podvrsta *E. m. velutina*, dok u svim ostalim regijama živi nominalna podvrsta *E. m. maugetii*. Takođe, poznato je da je Gibraltarski moreuz predstavljaо značajnu geografsku barijeru za pojedine taksonе (Escudero i sar., 2010; Terrab i sar., 2008).

Što se tiče sposobnosti disperzije vrste *E. maugetii*, može se prepostaviti da su adulти koji mogu da lete, tzv. makropterne forme, u prošlosti mogle uspešno savladati različite geografske barijere (npr. planinske masive), verovatno tokom duge vremenske skale. Na taj način dosezale su do najpogodnijih staništa za život, koja se nalaze u

klisurama reka i dolinama, uz optimalne uslove za njihov opstanak. Poznato je da predstavnici roda *Elmis* mogu imati mešovite populacije, koje pored makropternih mogu imati i brahipterne forme, koje karakteriše smanjena disperzivna sposobnost, jer nisu u mogućnosti da lete (Elliot, 2008a; Shepard, 2019). Kao i u slučaju larvi, pretpostavlja se da se ove forme samo mogu spustiti nizvodno ili, povremeno, biti odnesene driftom sa drugim bentosnim organizmima u bliska susedna vodna tela tokom perioda visokih vodostaja i poplavnih talasa (Elliot, 2008b). Ograničene disperzivne moći akvatičnih tvrdokrilaca, čak i onih koji imaju sposobnost letenja, mogle bi promovisati alopatričku specijaciju (Abellán i sar., 2012; Arribas i sar., 2012b). S druge strane, kod roda *Elmis* u Evropi, česta je simpatrija između vrsta koje naseljavaju isti vodotok (Alonso i d'Alys, 2018).

Kolonizacija nenaseljenih staništa vrste *Elmis maugetii* u severnim delovima njenog areala u Evropi mogla je početi sa Balkanskog poluostrva, za koje se pretpostavlja da je glavni glacijalni refugijum ove vrste u Evropi (Novaković i sar., u pripremi), i nastaviti se preko srednje, severne i zapadne Evrope, sve do Pirinejskog poluostrva (Španija) i Maroka (severna Afrika), što je potkrepljeno rezultatima koji proizilaze iz ovog istraživanja.

Značaj pleistocenskih refugijuma na Balkanu posebno je značajan za proces specijacije familije Elmidae, a i drugih grupa insekata koje su nepovoljne periode u geološkoj istoriji preživljavale u takvim tipovima izolovanih staništa. U refugijalnim staništima, usled alopatričke specijacije, česta je pojava taksona sa izraženom ekofenotipskom varijabilnošću, u odnosu na tipične forme koje su široko rasprostranjene u drugim tipovima vodenih staništa. Morfološki karakteri taksona elmida visoko su varijabilni, zbog izražene morfološke plastičnosti kod ove grupe insekata. Kod ove grupe u znatnoj meri je izražena ekofenotipska varijabilnost, koja otežava pouzdanu identifikaciju taksona, posebno kod vrsta rodova *Elmis* i *Limnius*. U nekim slučajevima u istim tipovima staništima istovremeno se može naći i do nekoliko kongeneričnih predstavnika pomenuta dva roda. Kod vrsta ovih rodova, s obzirom na izraženu morfološku plastičnost i ekofenotipsku varijabilnost, što je potvrđeno ovim istraživanjem, ne isključuje se mogućnost postojanja klinalne varijabilnosti taksona. Takode, istraživanjima u Hrvatskoj ukazano je da su na četiri izvora populacije roda

*Elmis* odlikovale velike varijacije morfoloških karaktera (Mičetić Stanković i sar., 2018a).

## 5.6. Valorizacija faune elmida područja Balkanskog poluostrva

Poznato je da je Balkansko poluostrvo faunistički jedinstveno područje za veliki broj endemičnih vrsta, na šta je ukazano je u radovima Marinković-Gospodnetić i sar. (1980) i Griffiths i sar. (2004) koji ističu jedinstvenost rečne mreže Balkana, naročito područja Dinarida, naglašavajući da je to, pored Pirinejskog poluostrva (Jäch i Balke, 2008; Ribera, 2000), glavni razlog visokog stupnja endemizma, što je potvrđeno i za akvatične tvdrokrilce (Mičetić Stanković i Jäch, 2012).

Područje Balkanskog poluostrva predstavlja biogeografski heterogeno područje, sa kompleksnom tipologijom vodotokova, uslovljrenom pre svega specifičnim geološkim i fitocenološkim, kao i mikroklimatskim odlikama različitih regija (Illies, 1978). U pogledu autohtonosti faune akvatičnih insekata i njene inventarizacije i valorizacije, od posebnog značaja za zaštitu su gornji tokovi potoka i reka u visokoplaninskim i planinskim regionima, bigrene barijere, karstna limnokrena i reokrena vrela u pobrđu, kao i visokoplaninski potoci sa specifičnim geološkim podlogama (Cvetković i sar., 2015), a koji su karakteristična staništa i za predstavnike familije Elmidae.

Fauna elmida slabo je proučena na području Balkanskog poluostrva, kao i u celoj južnoj Evropi. Taksonomskim istraživanjem familije Elmidae područja Balkanskog poloustrva, i to u skladu sa pristupom integrativne taksonomije, koja objedinjuje morfološke, morfometrijske i molekularne analize taksona izneta su nova saznanja o ovoj relativno slabo proučenoj grupi akvatičnih tvrdokrilaca. Preliminarna identifikacija jedinki elmida za morfometrijsku analizu u ovoj disertaciji vršena je u sklopu hidrobiološkog monitoringa voda na osnovu karaktera spoljašnje morfologije, gde su one korištene kao bioindikatorska grupa. Tek će se na osnovu “*time-consuming*” taksonomskog pristupa i izrade komparativne zbirke *species*-specifičnih *aedoeagus*-a elmida Balkanskog poluostrva moći sa sigurnošću potvrditi taksoni koji su trenutno označeni kao *conformis* (*cf.*). Naime kod spornih taksona, problem taksonomske rezolucije ključan je u identifikaciji jedinki kada se ona vrši samo na osnovu predloženih morfoloških karaktera. Iz tog razloga, u budućim istraživanjima neophodno

je jedinke pripremiti na način da se genitalije mužjaka izdvoje od ostatka jedinke (koja će se koristiti za molekularne analize), i označe istovetnim brojem za potrebe morfoloških analiza genitalija. Ekstrakcijom genitalija omogućuje se minimalno oštećenje habitusa, a opet dovoljno za ulazak potrebnih pufera za molekularne analize. Na taj način ostaje očuvana jedinka, a i genitalije, što je neophodno za detaljnija morfološka istraživanja pojedinih vrsta elmida.

## 6. ZAKLJUČCI

Doktorska disertacija „Morfometrijska i filogenetska analiza vrsta familije Elmidae (Insecta: Coleoptera) Balkanskog poluostrva” je obuhvatila nekoliko aspekata morfometrijske i filogenetske analize vrsta familije Elmidae Balkanskog poluostrva, na osnovu kojih se mogu izneti sledeći zaključci:

- Istraživanja koja su sprovedena predstavljaju osnov budućeg sistematskog istraživanja faune elmida Srbije, kao i potvrdu nalaza do sada upitnih vrsta za područje Srbije. Takođe potvrđena je nužnost sveobuhvatne taksonomske analize elmida Balkana kojom će se uključiti i morfološke karakteristike *aedoeagus-a*.
- Morfometrijska analiza šest odabralih vrsta iz dva roda familije Elmidae sa Balkanskog poluostrva, *Limnius* i *Elmis* (*Limnius opacus*, *L. intermedius* i *L. volckmari*; *Elmis cf. aenea*, *E. cf. maugetii* i *E. cf. rioloides*) je potvrdila njihov taksonomski status poznat iz literaturnih navoda.
- Na osnovu analize tri formirana morfometrijska indeksa (odnosa dužine i širine glave, odnosa dužine i širine pronotuma, i odnosa dužine i maksimalne širine abdomena) i odabralih 13 morfometrijskih karaktera, dokazano je da je izražena intra- i interpopulaciona varijabilnost ispitivanih taksona.
- U odnosu na sličnosti izmerenih fizičkih i hemijskih parametara na ispitivanim lokalitetima, vrste roda *Elmis* su sličnije i odlikuje ih znatno manja intrapopulaciona varijabilnost pojedinih morfometrijskih karaktera nego vrste roda *Limnius*, ali pretpostavlja se i da granulacija podloge ima znatan uticaj na morfometriju vrsta, kao i na sastav i strukturu njihovih populacija.
- Heterogenost klastera konstruisanih samoorganizujućih mapa ukazuje na postojanje znatne morfometrijske varijabilnosti najvećeg broja analiziranih

morfometrijskih karaktera i morfometrijskih indeksa kod svih ispitivanih vrsta elmida.

- Analizom korelacije hidroloških parametara (vodostaj, proticaj i dubina vode) i ispitivanih morfometrijskih karaktera (dužina tela, dužina glave i maksimalna širina protoraksa) adultnih jedinki vrste *E. maugetii*, ustanovljeno je da je od svih merenih hidroloških parametara jedino proticaj značajno korelisan sa svim morfometrijskim karakterima.
- Filogenetskom analizom taksona familije Elmidae područja Balkanskog poluostrva (13 lokaliteta iz 5 zemalja: Srbija, Hrvatska, Bugarska, Severna Makedonija i Grčka), konstrukcijom filogenetskih stabala i uporednom analizom dobijenih sekvenci sa ostalim sekvencama taksona iz BOLD i NCBI baze nukleotida, zaključeno je da je intraspecijska varijabilnost među analiziranim taksonima mala, što je i očekivano jer su korišćeni konzervativni barkoding markeri.
- Od ukupno 51 uzorka elmida, sekvencirano je 19 jedinki. “Blast” pretragom identifikovano je 6 vrsta (*Elmis maugetii*, *Riolus cupreus*, *Normandia nitens*, *Oulimnius tuberculatus*, *Limnius intermedius* i *Limnius volckmari*), a tri klastera uzoraka determinisana su samo do nivoa roda (*Stenelmis* sp., *Elmis* spp.). Na osnovu dijagnostičkih morfoloških karaktera, ovi taksoni su identifikovani do vrste: *Elmis syriaca zoufali* (prvi barkod vrste) i *Stenelmis puberula*, koja je nova vrsta u entomofauni Bugarske.
- Dobijeni rezultati filogenetskog istraživanja elmida ukazuju da su molekularne analize sekvenciranih taksona u skladu sa postojećom sistematikom familije Elmidae baziranoj na morfološkim karakterima.
- Pojedine vrste familije Elmidae (*Elmis maugetii*, *Oulimnius tuberculatus* i *Limnius volckmari*) sa područja Balkanskog poluostrva filogenetski se neznatno razlikuju u odnosu na šire područje evropskog kontinenta. Geografska

varijabilnost analiziranih COI fragmenta mitohondrijalne DNK istih taksona familije iz različitih limnofaunističkih regiona Balkanskog poluostrva, a i Evrope je mala, što je i očekivano, imajući u vidu konzervativnost markera mtCOI.

- Ispitivanjem genetičke varijabilnosti vrste *Elmis maugetii*, koja je korišćena kao model, dokazano je da je genetički diverzitet vrste niži u severnim regionima Evrope. Evoluciona istorija ove vrste otkriva da je mogući postglacijalni pleistoicenski koridor rekolonizacije počeo sa područja Balkanskog poluostrva, koje predstavlja njen glavni glacijalni refugijum u Evropi, a nastavio se preko srednje, severne i zapadne Evrope, sve do Pirinejskog poluostrva.
- Poređenjem sekvenci vrste *Elmis maugetii* dokazano da se jedinke iz Maroka (severna Afrika) neznatno razlikuju u odnosu na evropske, jer je u pitanju druga podvrsta *E. m. velutina*, dok u Evropi živi nominalna podvrsta *E. m. maugetii*. Generalno, genetička struktura različitih populacija vrste *E. maugetii* u Evropi i severnoj Africi takođe je okarakterisana malom varijabilnošću mitohondrijalne DNK.

## 7. REFERENCE

- Abellán, P., Sánchez-Fernández, D., Velasco, J., Millán A. (2005). Assessing conservation priorities for insects: Status of water beetles in southeast Spain. *Biological Conservation* 121: 79–90 pp. doi: 10.1016/j.biocon.2004.04.011.
- Abellán, P., Ribera, I. (2011). Geographic location and phylogeny are the main determinants of the size of the geographical range in aquatic beetles. *BMC Evolutionary Biology* (11): 344 pp. doi: 10.1186/1471-2148-11-344.
- Abellán, P., Arribas, P., Svenning, J. C. (2012). Geographical habitat templates overrides late Quartenary climate change as a determinant of range dynamics and phylogeography in some habitat-specialists water beetles. *Journal of Biogeography* 39: 970–983 pp. doi: 10.1111/j.1365-2699.2011.02654.x.
- Agencija za zaštitu životne sredine (2012). Rezultati ispitivanja kvaliteta površinskih i podzemnih voda za 2011. godinu, Ministarstvo energetike, razvoja i zaštite životne sredine, Beograd.
- Agencija za zaštitu životne sredine (2017). Rezultati ispitivanja kvaliteta površinskih i podzemnih voda za 2015. godinu, Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine, Beograd.
- Agencija za zaštitu životne sredine (2017). Rezultati ispitivanja kvaliteta površinskih i podzemnih voda za 2016. godinu, Ministarstvo zaštite životne sredine, Beograd.
- Agencija za zaštitu životne sredine (2018). Rezultati ispitivanja kvaliteta površinskih i podzemnih voda za 2017. godinu, Ministarstvo zaštite životne sredine, Beograd.
- Aksu, A. E., Hiscot, R.N., Yaşar, D. (1999). Oscillating Quartenary water levels of the Marmara Sea and vigorous outflow into the Aegean Sea from the Marmara Sea-Black Sea drainage corridor. *Marine Geology* 153 (1-4): 275–302 pp. doi: 10.1016/S0025-3227(98)00078-4
- Allen, K. R. (1941). Studies on the biology of the early stages of the salmon (*Salmo salar*). 2. Feeding habits. *Journal of Animal Ecology* (10): 47–76 pp.
- AQEM Consortium (2002). Manual for the application of the AQEM system: A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates developed for the purpose of the Water Framework

- Directive: Version 1.0, February 2002 [Internet]. EC Project; 2002 [cited 2019 Nov 10]. Available from: [www.aqem.de](http://www.aqem.de).
- Alonso, C., d'Alys, L. (2018). Le Monde des insectes Forum communautaire francophone des insectes et autres arthropodes. Elmidae. <https://www.insecte.org/forum/viewtopic.php?t=102852>
- Arribas, P., Andújar, C., Sánchez-Fernández, D., Abellán, P., Millán, A. (2012a). Integrative taxonomy and conservation of cryptic beetles in the Mediterranean region (Hydrophilidae). *Zoologica Scripta* 42: 182–200 pp. doi: 10.1111/zsc.12000.
- Arribas, P., Velasco, J., Abellán, P., Sánchez-Fernández, D., Andújar, C., Calosi, P., Millán, A., Ribera, I., Bilton, D. (2012b). Dispersal ability rather than ecological tolerance drives differences in range size between lentic and lotic water beetles (Coleoptera: Hydrophilidae). *Journal of Biogeography* 39: 984–994 pp. doi: 10.1111/j.1365-2699.2011.02641.x.
- Arribas, P., Andújar, C., Abellán, P., Velasco, J., Millán, A., Ribera, I. (2014). Tempo and mode of the multiple origins of salinity tolerance in a water beetle lineage. *Molecular Ecology* 23 (2): 360–373 pp. doi: 10.1111/mec.12605.
- Arnott, S. E., Jackson, A. B., Alarie, Y. (2006). Distribution and potential effects of water beetles in lakes recovering from acidification. *Journal of the North American Benthological Society* 25 (4): 811–824 pp. doi: 10.1899/0887-3593(2006)025[0811:DAPEOW]2.0.CO;2.
- Ashe, P., O' Connor, J. P., Murray, D. A. (1998). A checklist of Irish aquatic insects. *Occasional Publication of the Irish Biogeographical Society* (3): 1–80 pp. doi: 10.1076/aqin.21.3.186.4524.
- Baca, S., Short, A. (2018). Notomicrus petrareptans sp. n., a new seep-dwelling species of Noteridae from Suriname (Coleoptera: Adephaga). *Zootaxa* 4388 (2): 182–190 pp. doi: 10.11646/zootaxa.4388.2.2.
- Barcode of Life Data System. (<https://www.barcodinglife.com>)
- Balmert, A., Holgler Florian, B., Ditsche-Kuru, P., Barthlott, W. (2011). Dry Under Water: Comparative Morphology and Functional Aspects of Air-Retaining Insect Surfaces. *Journal of Morphology* 272: 442–451 pp. doi: 10.1002/jmor.10921.

- Bates, A. J., Sadler, J. P., Perry, J. N., Fowles, A. P. (2007). The microspatial distribution of beetles (Coleoptera) on exposed riverine sediments (ERS). *European Journal of Entomology* 104: 479–487 pp. doi: 10.14411/eje.2007.068.
- Beier, M. (1948). Zur Kenntnis von Körperbau und Lebensweise der Helminen (Coleoptera, Dryopidae). *Eos Madrid* 24 (2): 123–211 pp.
- Bennas, N., Sánchez-Fernández, D., Abelian, P., Millán, A. (2009). Analyse de la vulnérabilité des coléoptères aquatiques dans la rive sud méditerranéenne: cas du Rif Marocain, Annales de la Société entomologique de France (N.S.). *International Journal of Entomology* 45 (3): 309–320 pp., doi: 10.1080/00379271.2009.10697616.
- Berthélémy, C. (1964). La zonation des Plécoptères et des Coléoptères dans les cours d'eau des Pyrénées. *Gewässer und Abwässer* 34/35: 77–79 pp.
- Berthélémy, C., Olmi, M. (1978). Dryopoidea. In: Illies, J. (Ed.), *Limnofauna Europaea*, 2<sup>nd</sup> edition, Fischer, Stuttgart, 315–318 pp.
- Berthélémy, C. (1979). Elmidae de la région paléarctique occidentale: systématique et répartition (Coleoptera Dryopoidea). *Annales de Limnologie* 15 (1): 1–102 pp. doi: 10.1051/limn/1979014.
- Beutel, R. G., Anton, E., Jäch, M. A. (2003). On the evolution of adult head structures and the phylogeny of Hydraenidae (Coleoptera, Staphyliniformia). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 41: 256–275 pp. doi.org/10.1046/j.1439-0469.2003.00224.x.
- Bocak, L., Barton, C., Crampton-Platt, A., Chesters, D., Ahrens, D., Vogler, A. P. (2014). Building the Coleoptera tree-of-life for >8000 species: composition of public DNA data and fit with Linnaean classification. *Systematic Entomology* 39: 97–110 pp. doi: 10.1111/syen.12037.
- Boukal, D. S., Boukal, M., Fikáček, M., Hájek, J., Klečka, J., Skalický, S., Šťastný, J., Trávníček, D. (2007). Catalogue of water beetles of the Czech Republic (Coleoptera: Sphaeriusidae, Gyrinidae, Haliplidae, Noteridae, Hygrobiidae, Dytiscidae, Helophoridae, Georissidae, Hydrochidae, Spercheidae, Hydrophilidae, Hydraenidae, Scirtidae, Elmidae, Dryopidae, Limnichidae, Heteroceridae, Psephenidae). *Klapalekiana* 43, Supplementum: 1–289 pp.

- Bournaud, M., Thibault, M. (1973). Le derive des organismes dans les faux courantes. *Annales d'hydrobiologie* (4): 11–49 pp.
- Bournaud, M., Richoux, P., Usseglio-Polatera, P. (1992). An approach to the synthesis of qualitative ecological information from aquatic Coleoptera communities. *Regulated Rivers Research & Management* 7 (2): 165–180 pp. doi: 10.1002/rrr.3450070205.
- Bradley, D., Ormerod, S. (2002). Community persistence among stream invertebrates tracks the North Atlantic Oscillation. *Journal of Animal Ecology* 70: 987–996 pp. doi: 10.1046/j.0021-8790.2001.00551.x.
- Brehm, G., Fiedler, K. (2003). Faunal composition of geometrid moths changes with altitude in an Andean montane rain forest. *Journal of Biogeography* 30: 431–440 pp. doi: 10.1046/j.1365-2699.2003.00832.x.
- Brito, P. H. (2005). The influence of Pleistocene glacial refugia on tawny owl genetic diversity and phylogeography in western Europe. *Molecular Ecology* 14: 3077–3094 pp. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02663.x.
- Brocher, F. (1912). Recherches sur la respiration des insectes aquatiques adultes-Les Elmides. *Annales de Biologie Lacustre* (5): 136–179 pp.
- Brojer, M., Jäch, M. A., Kodada, J., Moog, O. (2017). Coleoptera: Water beetles s.l. In: Moog, O., Hartmann, A. (Eds.), *Fauna Aquatica Austriaca*, 3rd Edition, BMLFUW, Wien.
- Brown, H. P. (1966). Effects of soap pollution upon stream invertebrates. *Transactions of the American Microscopical Society* 85 (1): pp. 167.
- Brown, H. P. (1973). Survival records for elmid beetles, with notes on laboratory rearing of various dryopoids (Coleoptera). *Entomological News* 84 (9): 278–284 pp.
- Brown, H. P. (1987). Biology of riffle beetles. *Annual Review of Entomology* (32): 253–273 pp.
- Brown, H. (1991). Elmidae (Dryopoidea). In: Stehr, F. (Ed.). *Immature Insects*, Vol. 2. Dubuque, Iowa, USA: Kendall/Hunt Publishing Company. pp. 404–407.
- Brown, H. P. (2008). Riffle Beetles (Coleoptera: Elmidae), In: Capinera, J. L. (Ed.), *Encyclopedia of Entomology*, Springer-Verlag New York, Inc.

- Brusven, M. A. (1970). Drift periodicity of some riffle beetles (Coleoptera: Elmidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 43 (4): 364–371 pp.
- Byttebier, B., Fischer, S., Torres, P. L. M.. (2012). Seasonal dynamics of larvae and adults of two Enochrus Thomson (Coleoptera: Hydrophilidae) species in temporary and permanent water bodies of an urban park in Buenos Aires. *Revista Chilena de Historia Natural* 85: 281–289 pp. doi: 10.4067/S0716-078X2012000300003.
- Burghelea, C., Zaharescu, D. G., Hooda, P., Palanca, A. (2011). Predatory aquatic beetles, suitable trace elements bioindicators. *Journal of Environmental Monitoring* : 1308–1315 pp. doi: 10.1039/c1em10016e.
- Cameron, S.L., Sullivan, J., Song, H., Miller, K. B., Whiting, M. F. (2009). A mitochondrial genome phylogeny of the Neuropterida (lace-wings, alderflies and snakeflies) and their relationship to the other holometabolous insect orders. *Zoologica Scripta* 38: 575–590 pp. doi: 10.1111/j.1463-6409.2009.00392.x
- Canestrelli, D., Aloise, G., Cecchetti, S., Nascetti, G. (2010). Birth of a hotspot of intraspecific genetic diversity: notes from the underground. *Molecular Ecology* 19: 5432–5451 pp. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04900.x.
- Caro, T., O'Doherty, G. (1999). On the Use of Surrogate Species in Conservation Biology. *Conservation Biology* 13: 805–814 pp. doi: 10.1046/j.1523-1739.1999.98338.x.
- Caterino, M. S., Shull, V. L., Hammond, P. M., Vogler, A. P. (2002). Basal relationships of Coleoptera inferred from 18S rDNA sequences. *Zoologica Scripta* 31: 41–49 pp.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1660 pp. doi: 10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x.
- Csabai, Z., Móra, A. (2003). Adatok a Dél-Alföld vízibogár-faunájának ismeretéhez (Coleoptera: Halipidae, Dytiscidae, Noteridae, Gyrinidae, Spercheidae, Hydrochidae, Hydrophilidae, Elmidae) (Contribution to the aquatic beetle fauna of the south part of the Great Hungarian Plain (Coleoptera: Haliplidae, Dytiscidae, Noteridae, Gyrinidae, Spercheidae, Hydrochidae, Hydrophilidae,

- Elmidae) (in Hungarian). *Folia Historico-Naturalia Musei Matraensis* 27: 145–159 pp.
- Csabai, Z., Boda, P., Bernáth, B., Kriska, G., Horváth, G. (2006). A ‘polarisation sun-dial’ dictates the optimal time of day for dispersal by flying aquatic insects. *Freshwater Biology* (51): 1341–1350 pp. doi: 10.1111/j.1365-2427.2006.01576.x.
- Cook, L., Alarie, Y., Babin-Fenske, J. (2006). Morphometric Analysis of *Dineutus emarginatus* (Say) (Coleoptera: Gyrinidae): Subspecies Designation Reconsidered. *The Coleopterists Bulletin* 60: 235–241 pp. doi: 10.1649/879.1.
- Cole, L. C. (1957). A surprising case of survival. *Ecology* 38 (2): 357 pp.
- Collier, K. J., Croker, G. F., Hickey, C. W., Quinn, J. M., Smith, B. S. (1995). Effects of hydraulic conditions and larval size on the microdistribution of Hydrobiosidae (Trichoptera) in two New Zealand rivers. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 29: 439–451 pp. doi: 10.1080/00288330.1995.9516678.
- Comes, H. P., Kadereit, J. W. (1998). The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science* 3 (11): 432–438 pp. doi: 10.1016/S1360-1385(98)01327-2.
- Cooter, J., Barclay, M. (2006). *A Coleopterist's Handbook*, 4th Edition. Amateur Entomologists' Society, 496 p.
- Crowson, R. A. (1956). Coleoptera. Introduction to keys and families. *Royal Entomological Society - Handbooks for the Identification of the British Insects* (1): 59 pp.
- Crowson, R. A. (1981). *The Biology of the Coleoptera*. Academic Press. New York. 802 p.
- Cvetković, V., Prelević, D., Schmid, S. M. (2015). Geology of South-Eastern Europe. In: Papić, P. (Ed.). *Mineral and Thermal Waters of Southeastern Europe*, pp. 1–29. doi: 10.1007/978-3-319-25379-4\_1.
- Čiampor, Jr F., Kodada J. I. (1998). Taxonomic revision of the genus *Macronychus* Müller (Coleoptera). In: Jäch, M. A., Ji, L. (Eds.). *Water Beetles of China*, 2nd ed., Wien, Austria, pp. 219–287.

- Čiampor, Jr F., Kodada, J. (2010). Taxonomy of the *Oulimnius tuberculatus* species group (Coleoptera: Elmidae) based on molecular and morphological data. *Zootaxa* 2670: 59–68 pp. doi: 10.11646/zootaxa.2670.1.4.
- Čiampor, Jr F., Čiamporová-Zaťovičová, Z. (2008). A new species of *Hedyselmis* Hinton and notes on the phylogeny of the genus (Coleoptera: Elmidae). *Zootaxa* 1781: 55–62 pp. 10.11646/zootaxa.1781.1.5.
- Čiampor, Jr F., Čiamporová-Zaťovičová, Z., Kodada, J. (2009). Description Of The Larva Of *Oulimnius echinatus* Berthélémy (Coleoptera: Elmidae: Elminae). *Zootaxa* (1984): 57–60 pp. doi: 10.5281/zenodo.185385.
- Čiamporová-Zaťovičová, Z., Čiampor, Jr F., Kodada, J. (2007). *Stenelmis puberula* Reitter (Coleoptera: Elmidae) - Description of larva and its association with adults, using DNA sequences. *Zootaxa* 1661: 17–28 pp.
- Čiamporová-Zaťovičová, Z., Čiampor, Jr F. (2011). Aquatic beetles of the alpine lakes: Diversity, ecology and small-scale population genetics. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 402. doi: 10.1051/kmae/2011064.
- Haran, J., Timmermans, M. J., Vogler, A. P. (2013). Mitogenome sequences stabilize the phylogenetics of weevils (Curculionoidea) and establish the monophyly of larval ectophagy. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67: 156–166 pp. doi: 10.1016/j.ympev.2012.12.022.
- De Szalay, F. A., Resh, H. V. (2000). Factors influencing macroinvertebrate colonization of seasonal wetlands: Responses to emergent plant cover. *Freshwater Biology* 45 (3): 295–308 pp. doi: 10.1111/j.1365-2427.2000.00623.xC.
- Drag, L., Hauck, D., Říčan, O., Schmitt, T., Shovkoon, D., Godunko, R., Curletti, G., Cižek, L. (2018). Phylogeography of the endangered saproxyllic beetle *Rosalia longicorn*, *Rosalia alpina* (Coleoptera, Cerambycidae), corresponds with its main host, the European beech (*Fagus sylvatica*, Fagaceae). *Journal of Biogeography* 45 (12): 2631–2644 pp. doi: 10.1111/jbi.13429.
- Drovetski, S. V., Fadeev, I. V., Rakovic, M., Lopes, R. J., Boano, G., Pavia, M., Koblik, E.A., Lohman, Y.V., Red'kin, Y. A., Aghayan, S. A., Reis, S. S., Drovetskaya, S. S., Voelker, G. (2018). A test of the European Pleistocene refugial paradigm,

- using a Western Palaearctic endemic bird species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 285. doi: 10.1098/rspb.2018.1606.
- Elliott, J. M. (1967). The food of trout (*Salmo trutta*) in a Dartmoor stream. *Archiv für Hydrobiologie* (4): 59–71 pp.
- Elliott, J. M. (2008a). The ecology of riffle beetles (Coleoptera: Elmidae). *Freshwater Reviews* (1): 189–203 pp. doi: 10.1608/FRJ-1.2.4.
- Elliott, J. M (2008b). Ontogenetic shifts in drift periodicity and benthic dispersal in elmid beetles. *Freshwater Biology* (53): 698–713 pp. doi: 10.1111/j.1365-2427.2007.01927.x.
- EN 27828: 1994/ISO 7828: 1985. Water quality. Methods for biological testing. Methods of biological sampling: guidance on handnet sampling of aquatic benthic macro-invertebrates.
- Escudero, M., Vargas, P., Arens, P., Ouborg, N.J., Luceño. M. (2010). The east-west-north colonization history of the Mediterranean and Europe by the coastal plant *Carex extensa* (Cyperaceae). *Molecular Ecology* 19 (2): 352–370 pp. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04449.x.
- Eyre, M. D., Foster, G. N., Foster, A. P. (1990). Factors affecting the distribution of water beetle species assemblages in drains of eastern England. *Journal of Applied Entomology* 109 (1-5): 217–225 pp. doi: 10.1111/j.1439-0418.1990.tb00043.x.
- Eyre, M. D., Pilkington, J. G., Carr, R., McBlane, R. P., Rushton, S. P., Foster, G. N. (1993). The running-water beetles (Coleoptera) of a river catchment in northern England. *Hydrobiologia* 264: 33–45 pp.
- Eyre, M., Luff, M., Woodward, J. (2003). Beetles (Coleoptera) on brownfield sites in England: An important conservation resource? *Journal of Insect Conservation* 7: 223–231 pp. doi: 10.1023/B:JICO.0000021020.66549.1e.
- Eyre, M., Foster, G., Foster, A. (2009). Factors affecting the distribution of water beetle species assemblages in drains of eastern England. *Journal of Applied Entomology* 109: 217–225 pp. doi: 10.1111/j.1439-0418.1990.tb00043.x.
- Fairchild, G. W., Faulds, A. M., Matta, J. F. (2000). Beetle assemblages in ponds: effects of habitat and site age. *Freshwater Biology* 44: 523–534 pp. doi: 10.1046/j.1365-2427.2000.00601.x.

- Fernando, C. H., Galbraith, D. (1973). Seasonality and dynamics of aquatic insects colonizing small habitats. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie, Germany* (18): 1564–1575 pp.
- 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): 294–299 pp.
- Forbes, A. A., Bagley, R.K., Beer, M. A., Hippee, C., A., Wildmayer, H. A. (2018). Quantifying the unquantifiable: why Hymenoptera, not Coleoptera, is the most speciose animal order. *BMC Ecology* 18, 21. doi: 10.1186/s12898-018-0176-x.
- Franken, J. M., Gardeniers, J. P., Beijer, J. A. J., Peeters, E. T. H. M. (2006). Effects of interstitial refugia and current velocity on growth of the amphipod *Gammarus pulex* Linnaeus. *Journal of the North American Benthological Society* 25 (3): 656–663 pp.
- Friday, L. E. (1988). *A key to the adults of British water beetles*. Field Studies Council, Darwin College, Cambridge.
- Gage, K. L. (1983). Wood utilization by *Macronychus glabratus* (Say) (Coleoptera: Elmidae). MS thesis. The University of Oklahoma, Norman, pp. 57.
- García-Criado, F., Fernández-Aláez, M. (1995). Aquatic Coleoptera (Hydraenidae and Elmidae) as indicators of the chemical characteristics of water in the Orbigo River basin (N-W Spain). *Annales De Limnologie-international Journal of Limnology* 31: 185–199 pp. doi: 10.1051/limn/1995017.
- García-Criado, F., Fernández-Aláez, M. (2001). Hydraenidae and Elmidae assemblages (Coleoptera) from a Spanish river basin: Good indicators of coal mining pollution?. *Archiv für Hydrobiologie* 150: 641–660 pp. doi: 10.1127/archiv-hydrobiol/150/2001/641.
- Giller, P. S., Malmqvist, B. (1998). *The Biology of Streams and Rivers*. Oxford University Press, Oxford.
- Gillett, C. P. D. T., Crampton-Platt, A., Timmermans, M. J. T. N., Jordal, B., Emersen, B. C., Vogler, A. P. (2014). Bulk de novo mitogenome assembly from pooled total DNA elucidates the phylogeny of weevils (Coleoptera: Curculionoidea).

*Molecular Biology and Evolution* (31): 2223–2237 pp. doi: 10.1093/molbev/msu154.

- Gillot, C. (2005). Entomology (3rd Edition). Springer: Netherlands, XVIII, 832 p.
- Grasser, U. (1994). The Elmidae (Coleóptera) communities of the crystalline Bohemian Mountains in northern Austria in relation to the distribution patterns indicating environmental changes. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 25: 1661–1666 pp. doi: 10.1080/03680770.1992.11900464.
- Grauvogl, M. (1992). Substratpräferenzen von *Elmis maugetii* Latr., *Oulimnius tuberculatus* Müll., *Limnius volckmari* Panz. (Coleoptera, Elmidae), *Leuctra geniculata* Steph. (Plecoptera) und *Ephemerella ignita* Poda (Ephemeroptera). *Nachrichtenblatt der Bayerischen Entomologen* 41: 1–6 pp.
- Griffiths, H., Krystufek, B., Reed, J. (2004). *Balkan Biodiversity: Pattern and Process in the European Hotspot*. Springer. doi: 10.1007/978-1-4020-2854-0.
- Grimaldi, D., Engel, M. S. (2005). *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press: xv + 755 pp.
- Hansen, M. (1987). *The Hydrophiloidea (Coleoptera) of Fennoscandia and Denmark*. E.J. Brill/Scandinavian Science Press, Leiden, 254 pp.
- Harpster, H. T. (1941). An investigation of the gaseous plastron as a respiratory mechanism in *Helichus striatus* LeConte. *Transactions of the American Microscopical Society* 60 (3): 329–358 pp.
- Harpster, H. T. (1944). The gaseous plastron as a respiratory mechanism in *Stenelmis quadrimaculata* Horn (Dryopidae). *Transactions of the American Microscopical Society* 63 (1): 1–26 pp.
- Hebauer, F. (1988). Gesichtspunkte der ökologischen Zuordnung aquatischer Insekten zu den Sukzessionsstufen der Gewässer. *Berichte der Bayerischen Akademie für Naturschutz und Landschaftspflege (ANL)* 12: 229–239 pp.
- Hebert, P. D., Cywinska A., Ball, S. L., de Waard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences* 270 (1512): 313–321 pp. doi: 10.1098/rspb.2002.2218.
- Hendrich, L., Morinière, J., Haszprunar, G., Hebert, P. D. N., Hausmann, A., Köhler, F., Balke, M. (2015). A comprehensive DNA barcode database for Central

- European beetles with a focus on Germany: Adding more than 3500 identified species to BOLD. *Molecular Ecology Resources* 15: 795–818 pp. doi: 10.1111/1755-0998.
- Hering, D., Verdonschot, P. F. M., Moog, O., Sandin, L. (2004). Overview and application of the AQEM assessment system. *Hydrobiologia* 516: 1–20 pp. doi: 10.1023/B:HYDR.0000025255.70009.a5.
- Hewitt, G. M. (1993). After the ice: parallelus meets erythropus in the Pyrenees. In: Harrison, R. G. (Ed.). *Hybrid zones and the evolutionary process*. New York, Oxford University Press, pp. 140–146.
- Hewitt, G. M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247–276 pp. doi: 10.1111/j.1095-8312.1996.tb01434.x.
- Hewitt, G. M. (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87–112 pp. doi: 10.1006/bijl.1999.0332.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913 pp. doi: 10.1038/35016000.
- Hewitt, G. (2004). The structure of biodiversity - Insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology* 1 (1): 4. doi: 10.1186/1742-9994-1-4.
- Hinton, H. E. (1939). An inquiry into the natural classification of the Dryopoidea based partly on a study of their internal anatomy (Col.). *Transactions of the Royal Entomological Society of London* 89 (7): 133–184 pp.
- Hoffsten, P-O. (2003). Effects of an extraordinarily harsh winter on macroinvertebrates and fish in boreal streams. *Archiv für Hydrobiologie* 157: 505–523 pp. doi: 10.1127/0003-9136/2003/0157-0505.
- Holland, D. G. (1972). *A key to the larvae, pupae and adults of the British species of Elminthidae*. Freshwater Biological Association. Scientific Publication No. 26. Freshwater Biological Association, Ambleside, 58 pp.
- Holló, I. (2012). Methodology for calculation of measurement uncertainty. Lower-Tisza Regional Environment and Nature Conservation Inspectorate, Laboratory, Hungary (internal document).

- Holomuzki, J. R., Biggs, B. J. F. (2003). Sediment texture mediates high-flow effects on lotic macroinvertebrates. *Journal of the North American Benthological Society* 22: 542–553 pp.
- Horváth, G., Kriska, G. (2008). Polarization vision in aquatic insects and ecological traps for polarotactic insects. *Aquatic Insects: Challenges to Populations*: 204–229 pp. doi: 10.1079/9781845933968.0204.
- Hunt, T., Vogler, A. P. (2008). A protocol for large-scale rRNA sequence analysis: towards a detailed phylogeny of Coleoptera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 289–301 pp. doi: 10.1016/j.ympev.2007.11.029.
- Hunt, T., Bergsten, J., Levkanicova, Z., Papadopoulou, A., St. John, O., Wild, R., Hammond, P. M., Ahrens, D., Balke, M., Caterino, M. S., Gómez-Zurita, J., Ribera, I., Barraclough, T. G., Bocakova, M., Bocak, L., Vogler, A. P. (2007). A Comprehensive Phylogeny of Beetles Reveals the Evolutionary Origins of a Superradiation. *Science* 318: 1913–1916 pp. doi: 10.1126/science.1146954.
- Hutchinson, G. E. (1993). *A treatise on limnology*. Volume IV: The zoobenthos. John Wiley & Sons, New York. 964 pp.
- Hynes, H. B. N. (1961). The invertebrate fauna of a Welsh mountain stream. *Archiv für Hydrobiologie* 57: 344–388 pp.
- Hynes, H. B. N. (1968). Further studies on the invertebrate fauna of a Welsh mountain stream. *Archiv für Hydrobiologie* 65: 360–379 pp.
- Hynes, H. B. N. (1972). *The Ecology of Running Waters*. Toronto: University of Toronto Press, 555 pp.
- Ibrahim, K., Nichols, R., Hewitt, G. M. (1996). Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal. *Heredity* 77 (3): 282–291 pp. doi: 10.1038/hdy.1996.142.
- Ikeda, H., Nishikawa, M., Sota T. (2012). Loss of flight promotes beetle diversification. *Nature Communications* 3: 648. doi: 10.1038/ncomms1659.

Institut za vode d.o.o., Bijeljina (2009). Monitoring kvaliteta površinskih voda u Republici Srpskoj - Izvještaj za 2008. godinu.

Illies, J. (1978) (Ed.). *Limnofauna Europaea*. Gustav Fischer Verlag, 474 p.

Ivanović, A., Kalezić, M. L. (2013). Evoluciona morfologija: teorijske postavke i geometrijska morfometrija. Biološki fakultet, Beograd.

Jäch, M. A. (1998). Annotated check list of aquatic and riparian/littoral beetle families of the world. In: *Water beetles of China*, Jäch M.A., Ji, L. (Eds.), Zoologisch-Botanische Gesellschaft in Österreich and Wiener Coleopterologenverein, pp. 25–42.

Jäch, M. (2013). Elmidae. In: *Fauna Europaea*, Alonso-Zarazaga, M. A. (2013). Coleoptera 1. Fauna Europaea version 2.6.2, <http://www.faunaeur.org>.

Jäch, M., Balke, M. (2008). Global diversity of water beetles (Coleoptera) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 419–442 pp. doi: 10.1007/s10750-007-9117-y.

Jäch, M. A., Dietrich, F., Raunig, B. (2005). Rote Liste der Zergwasserkäfer (Hydraenidae) und Krallenkäfer (Elmidae) Österreichs (Insecta: Coleoptera), pp. 211–284. In: Rote Listen gefährdeter Tiere Österreichs, Zulka, K.P. (Ed.) Checklisten, Gefährdungsanalyse, Handlungsbedarf. Part 1: Säugetiere, Vögel, Heuschrecken, Wasserkäfer, Netzflügler, Schnabelfliegen, Tagfalter (Grüne Reihe des Lebensministeriums, Vol. 14/1). – Wien: Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wirtschaft, 407 pp.

Jäch, M. A., Kodada J., Brojer, M., Shepard, W. D., Čiampor, Jr F. (2016). Coleoptera: Elmidae and Protelmidae. World Catalogue of Insects, Vol. 14, Brill, Leiden.

Jardine, B. (2010). Evolution & Phylogeny of Some Major Aquatic Radiations of Coleoptera. *Aquatic Entomology*.

Jaskuła, R., Buczyński, P., Przewoźny, M. (2005). New localities evidence that *Macronychus quadrituberculatus* Müll. (Coleoptera: Elmidae) is not rare in Poland. *Lauterbornia* 55: 35–41 pp.

Jones, J. R. E. (1951). An ecological study of the river Towy. *Journal of Animal Ecology* 20: 68–86 pp.

- Jovović, L., Bruvo-Madaric, B., Mičetić Stanković, V., Jäch, M., Kučinić, M. (2015). Phylogeny and phylogeography of genus *Elmis* (Coleoptera, Elmidae) in karstic running waters in southeastern Europe. 12th Croatian Biological Congress with International Participation, Book of Abstracts, Sveti Martin na Muri, 18-23rd September.
- Kálmán, Z., Kálmán, A., Csabai, Z. (2009). Contribution to the riffle beetle fauna of Hungary (Coleoptera: Elmidae). *Acta Biologia Debrecina Supplementum Oecologica Hungarica* 20: 127–144 pp.
- Karadžić, B. (2013). Flora: a software package for statistical analysis of ecological data. *Water Research and Management Journal* 3 (1): 45–54 pp.
- Katoh, K., Standley, D. M. (2013). MAFFT. Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780 pp. Molecular biology and evolution. doi: 10.1093/molbev/mst010.
- Kenney, J. F., Keeping, E. S. (1962). Linear Regression and Correlation. Ch. 15 in *Mathematics of Statistics*, Pt. 1, 3rd ed. Princeton, NJ: Van Nostrand, 252–285 pp.
- Kerovec, M. (1988). Ekologija kopnenih voda (Ecology of inland waters). Mala ekološka biblioteka, Zagreb.
- Kim, Ki-G., Hong, M., Kim, M. J., Im, H., Kim, M., Bae, C., Seo, S., Lee, S., H., Hyun, Kim, I. (2009). Complete mitochondrial genome sequence of the yellow-spotted long-horned beetle *Psacothaea hilaris* (Coleoptera: Cerambycidae) and phylogenetic analysis among coleopteran insects. *Molecules and Cells* 27: 429–441 pp. doi: 10.1007/s10059-009-0064-5.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120 pp. doi: 10.1007/BF01731581.
- Klečka, J. (2008). The structure and dynamics of a water beetle community in a semipermanent wetland (Vrbenské rybníky Nature Reserve, South Bohemia).

(Bachelor Thesis). Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Kodada, J., Jäch, M. A. (2005). Elmidae Curtis, 1830. Handbook of Zoology 4: 471–496 pp.

Kodada, J., Čiampor, Jr F. (2014). *Ancyronyx reticulatus* and *A. pulcherrimus*, two new riffle beetle species from Borneo, and discussion about elmid plastron structures (Coleoptera: Elmidae). *Zootaxa* 3760: 383–395 pp. doi: 10.11646/zootaxa.3760.3.5.

Kodada, J., Jäch, M. A., Čiampor, Jr F. (2016). 19.2. Elmidae Curtis, 1830, In: Beutel RG, Leschen RAB (Eds) Handbook of Zoology, Volume IV (Part 38), Coleoptera, Beetles, Volume 1: Morphology and Systematics (Archostemata, Adephaga, Myxophaga, Polyphaga partim), 2nd ed., Berlin: Walter de Gruyter, 561–589 pp.

Kohonen, T. (1982). Self-organized formation of topologically correct feature maps.

*Biological Cybernetics* 43: 59–69 pp. doi: 10.1007/BF00337288.

Kryštufek, B., Bužan, E. V. (2008). Rarity and decline in palaeoendemic Martino's vole *Dinaromys bogdanovi*. *Mammal Review* 38 (4): 267–284 pp. doi: 10.1111/j.1365-2907.2008.00127.x.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33. 1870–1874 pp. 10.1093/molbev/msw054.

Lachenbruch, P. A., Goldstein, M. (1979). Discriminant Analysis. *Biometrics* 35 (1): 69–85 pp. doi: 10.2307/2529937.

Lancaster, J., Hildrew, A. G. (1993). Flow refugia and the microdistribution of lotic macroinvertebrates. *Journal of the North American Benthological Society* 12: 385–393 pp. doi: 10.2307/1467619.

Lancaster, J., Bélanger-Buffin, T., Reid, I., Rice, S. (2006). Flow and substratum-mediated movement by a stream insect. *Freshwater Biology* 51: 1053–1069 pp. doi: 10.1111/j.1365-2427.2006.01554.x.

- Lancaster, J., Downes, B. (2013). *Aquatic Entomology*. Chapter Evolution, biogeography and aquatic insect distributions. Oxford and New York. Oxford University Press. doi: 10.1093/acprof:oso/9780199573219.001.000.
- Landin J. (1980). Habitats, life histories, migration and dispersal by flight of two water-beetles *Helophorus brevipalpis* and *H. strigifrons* (Hydrophilidae). *Holarctic Ecology* 3: 190–201 pp.
- Landin J., Vepsäläinen K. (1977). Spring dispersal flights of pond-skaters *Gerris* spp. (Heteroptera). *Oikos* 29: 156–160 pp.
- Librado, P., Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25 (11): 1451–1452 pp. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187.
- Linský, M., Čiamporová-Zaťovičová, Z., Čiampor, Jr F. (2019). Four new species of *Hexanchorus* Sharp from Ecuador (Coleoptera, Elmidae) with DNA barcoding and notes on the distribution of the genus. *ZooKeys* 838: 85–109 pp. doi: 10.3897/zookeys.838.33086.
- Lomolino, M. V., Pijanowski, B. C, Gasc, A. (2015). The silence of biogeography. *Journal of Biogeography* 42. doi: 10.1111/jbi.12525.
- Lompe, A. (2014). (n. A.W. Steffan, W. Pankow). Käfer Europas. Pankow, W. (o.J.): Arbeitsblatt zur Bestimmung der Gattung *Limnius*, *Elmis* u.a. – unveröffentlicht. <http://coleonet.de/coleo/texte/elmidae.htm>.
- Lorenz, A., Hering, D., Feld, C., Rolauffs, P. (2004). A New Method for Assessing the Impact of Hydromorphological Degradation on the Macroinvertebrate Fauna of Five German Stream Types. *Hydrobiologia* 516 (1): 107–127 pp. doi: 10.1023/B:HYDR.0000025261.79761.b3.
- Lundkvist, E., Landin, J., Karlsson, F. (2002). Dispersing diving beetles (Dytiscidae) in agricultural and urban landscapes in south-eastern Sweden. *Annales Zoologici Fennici* 39: 109–123 pp.
- Maier, C., Short, A. (2013). A revision of the Lutrochidae (Coleoptera) of Venezuela, with description of six new species. *Zootaxa* 3637 (3): 285–307 pp. doi: 10.11646/zootaxa.3637.3.3.
- Maitland, P. S. (1967). The ecology of four species of Elminthidae in Scottish river. *Archiv für Hydrobiologie* 63: 104–122 pp.

- Manzo, V., Archangelsky, M. (2012). Two new species of Elmidae (Coleoptera) from Argentina. *Zootaxa* 3478: 267–281 pp. doi: 10.11646/zootaxa.3478.1.26.
- Marcus, L. F. (1990). *Traditional morphometrics*, Chapter 4. In: Proceedings of the Michigan Morphometric Workshop. Special Publication No. 2. Rohlf, F. J. , Bookstein, F. L. (Eds.), Ann Arbor MI, The University of Michigan Museum of Zoology: 77–122 pp.
- Marinković-Gospodnetić, M (1980). Fauna Trichoptera SR Srbija. *Zbornik radova o fauni Srbije* 1: 71–84 pp.
- McCafferty, W. (1983). *Aquatic Entomology: The Fishermen's and Ecologists' Illustrated Guide to Insect and Their Relatives*. Boston, Massachusetts, USA: Jones and Bartlett Publishers, Inc., 448 p.
- McKenna, D. D., Farrell, B.D. (2009). Beetles (Coleoptera) In: *The Timetree of Life*, Hedges, S. B., Kumar, S. (Eds.), Oxford University Press, Oxford, pp. 278–289.
- McKenna, D., Sequeira, A., Marvaldi, A., Farrell, B. (2009). Temporal lags and overlap in the diversification of weevils and flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 7083–7088 pp. doi: 10.1073/pnas.0810618106.
- McKenna, D.D. (2011a). Temporal lags and overlap in the diversification of weevils and flowering plants: recent advances and prospects for additional resolution. *American Entomologist* 57: 54–55 pp. doi: 10.1073/pnas.0810618106.
- McKenna, D. D. (2011b). Towards a temporal framework for “Inordinate Fondness”: reconstructing the macroevolutionary history of beetles (Coleoptera). *Entomologica Americana* 117: 28–36 pp.
- McKenna, D.D., Wild A.L., Kanda, K., Bellamy, C. L., Beutel, R.G, Caterino, M.S., Farnum C. W., Hawks, D. C., Ivie, M.A, Jameson, M. L., Leschen, R.A.B., Marvaldi, A.E, McHugh, J. V., Newton, A.F., Robertson, J.A., Thayer, M. K., Whiting, M. F., Lawrence, J.F., Slipinski, A., Maddison, D. R., Farrell, B.D. (2015). The beetle tree of life reveals that Coleoptera survived end-Permian mass extinction to diversify during the Cretaceous terrestrial revolution. The Royal Entomological Society, *Systematic Entomology* 40 (4): 835–880 pp. doi: 10.1111/syen.12132.

- McPeek, M. A. (1990). Determination of species composition in the *Enallagma* damselfly assemblages of permanent lakes. *Ecology* (71): 83–98 pp.
- Melo, A. S., Niyogi, D. K., Matthaei, C. D., Townsend, C. R. (2003). Resistance, resilience and patchiness of invertebrate assemblages in native tussock and pasture streams in New Zealand after a hydrological disturbance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60: 731–739 pp. doi: 10.1139/f03-061.
- Mérigoux, S., Dolédec, S., (2004). Hydraulic requirements of stream communities: a case study on invertebrates. *Freshwater Biology* 49: 600–613 pp. doi: 10.1111/j.1365-2427.2004.01214.x.
- Messner, B., Langer, C. (1984). Atmungsfähige Deckfliigel als Anpassung an die submerse Lebensweise bei Kiefern. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere* 111: 469–484 pp.
- MEW, Ministry of Environment and Water of Bulgaria (2014). Inventory of the status of the components of the environment within the territory of the Bulgarka Natural park. Final report of the Project “Development of a plan for the management of Bulgarka Natural park” (Nº DIR-593210-1-5), 73 p. (in Bulgarian).
- Mičetić Stanković, V. (2012). Vodeni kornjaši (Insecta: Coleoptera) u mikrostaništma krških izvora i tekućica. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb. Doktorska disertacija, XXIV+226 pp.
- Mičetić Stanković, V., Jäch, M. A. (2012). Description of a new species of the “Haenya” lineage (Coleoptera: Hydraenidae) from the Republic of Macedonia. *Zootaxa* 3503: 82–88 pp. doi: 10.5281/zenodo.212904.
- Mičetić Stanković, V., Jäch, M. A., Kučinić, M. (2015). Annotated checklist of Croatian riffle beetles (Insecta: Coleoptera: Elmidae). *Natura Croatica* 24: 93–109 pp. doi: 10.20302/NC.2015.24.5.
- Mičetić Stanković, V., Jäch, M. A., Vučković, I., Popijač, A., Kerovec, M., Kučinić, M. (2018a). Ecological traits of water beetles in a karstic river from the Eastern Mediterranean region. *Limnologica* 71: 75–88 pp. doi:10.1016/j.limno.2018.06.002.

- Mičetić Stanković, V., Bruvo-Madarić, B., Jäch, M., Kučinić, M. (2018b). Elmisietscheli Steffan, 1958 (Insecta: Coleoptera: Elmidae) in Croatia: first record and DNA barcoding. *Natura Croatica* 27 (1): 185–194 pp. doi: 10.20302/NC.2018.27.9.
- Mičetić Stanković, V., Ivković, M., Stanković, I., Kružić, P., Kučinić, M. (2019). Spatio-temporal distribution and species traits of water beetles along an oligotrophic hydrosystem: a case study. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 55, 22. doi: 10.1051/limn/2019019.
- Miserendino, M., Archangelsky, M. (2006). Aquatic Coleoptera Distribution and Environmental Relationships in a Large Patagonian River. *International Review of Hydrobiology* 91: 423–437 pp. doi: 10.1002/iroh.200510854.
- Mittermeier, R.A., Myers, N., Thomsen, J. B., da Fonseca, G. A. B., Olivieri, S. (1998). Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. *Conservation Biology* 12 (3): 516–520 pp. doi: 10.1046/j.1523-1739.1998.012003516.x.
- Moog, O. (2002). Fauna Aquatica Austriaca. 2nd edition. Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft. Wien, Austria: Austrian Federal Ministry of Agriculture Forestry Environment & Water Management, Wasserwirtschaftskataster, Vienna.
- Moog, O., Jäch, M. A. (1995). Teil IIIC Längenzonale Verteilung nach biozentralischen Regionen, Coleoptera, p. 3. In: *Fauna Aquatica Austriaca*, Moog, O. (Ed.), Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Wien.
- Moog, O., Jäch, M. A. (2003). Elmidae. In: *Fauna Aquatica Austriaca*, Moog, O. (Ed.), Edition 2002. Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, Wien: [5] + 2 + 12 + 10 + 10 + 10 p.
- Moss, B. (2010). *Ecology of Freshwaters – A View for the Twenty-first Century*. Wiley-Blackwell, West Sussex.

- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, G. C., da Fonseca, G. A. B., Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858 pp. doi: 10.1038/35002501.
- Múrria, C., Bonada, N., Vellend, M., Zamora-Munoz, C., Alba-Tercedor, J., Sainz-Cantero. C. E., Garrido, J., Acosta, R., El Alami, M., Barquín, J., Derka, T., Álvarez-Cabria, M, Sáinz-Bariain, M., Filipe, F. A., Vogler, A. P. (2017). Local environment rather than past climate determines community composition of mountain stream macroinvertebrates across Europe. *Molecular Ecology* 26 (21): 6085–6099 pp. doi: 10.1111/mec.14346.
- NCBI - NIH. GenBank - www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York. x + 512 pp.
- Newman, D. L., Funk, R. C. (1984). Drift of riffle beetles (Coleoptera: Elmidae) in a small Illinois stream. *Great Lakes Entomologist* 17 (4): 211–214 pp.
- Nicolet, P., Biggs J., Fox, G., Hodson, M. J., Reynolds, C., Whitfield, M., Williams, P. (2004). The wetland plant and macroinvertebrate assemblages of temporary ponds in England and Wales. *Biological Conservation* 120: 261–278 pp.
- Nilsson, A. (1996). *Aquatic Insects of North Europe, A Taxonomic Handbook*. Volume 1. Ephemeroptera, Plecoptera, Neuroptera, Megaloptera, Coleoptera, Trichoptera and Lepidoptera. Apollo Books, Stenstrup. 274 p.
- Novaković, B., Mesaroš, G. (2014). First recent record of *Macronychus quadrituberculatus* Müller, 1806 (Elmidae: Coleoptera) in Serbia. *Water Research and Management Journal*, Belgrade. 4 (3): 35–37 pp.
- Novaković, B., Marković, V., Ilić, M., Tubić, B., Đuknić, J., Živić, I. (2016). Recent Records and Ecological Notes on the Riffle Beetle *Potamophilus acuminatus* (Fabricius, 1792) (Coleoptera: Elmidae) in Serbia. *Acta Zoologica Bulgarica* 68 (2): 207–214 pp.
- Novaković, B. B., Teofilova, T. M., Pandakov, P. G, Živić, I. M. (2020a). New distributional records of rare riffle beetles (Coleoptera: Elmidae) from the Balkan Peninsula. *Archives of Biological Sciences* 72 (1): 129–135 pp. doi: 10.2298/ABS190908006N.

- Novaković, B., Marković, V., Mesaroš, G., Živić, I. (2020b). The riffle beetle *Macronychus quadrituberculatus* Müller, 1806 (Coleoptera: Elmidae): recent findings in Serbia with ecological notes. *Biologia*, SpringerLink. doi: 10.2478/s11756-020-00450-w.
- Novakovic, B. (2020c). Influence of hydraulic pressure on morphometric variability of riffle beetle *Elmis maugetii* Latreille, 1802 (Coleoptera: Elmidae). *Tehnika* 75: 105–109 pp. doi: 10.5937/tehnika2001105N.
- Olmi, M. (1976). *Coleoptera, Dryopidae, Elminthidae*. Fauna d' Italia, 12. Edizioni Calderini, Bologna.
- Oxnard, C. E. (1978). One biologist's view of morphometrics. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 9: 219–241 pp.
- Ødegaard, F., Hanseen, O., Domen, D. (1996). Coleoptera Biller. In: *Limnofauna Norwegica*, Aagard, K., Dolmen, D. (Eds.), Tapir Forlag, Trondheim, pp. 151–167.
- Pajunen, V. I., Jansson, A. (1969). Dispersal of the rock pool corixids *Arctocoris carinata* (Sahlb.) and *Callicorixa producta* (Reut.) (Heteroptera, Corixidae). *Annales Zoologici Fennici* 6: 391–427 pp.
- Palmer, M. W. (2000). Ordination methods for ecologists. <http://www.okstate.edu/artsci/botany/ordinate>.
- Palmer, M. A., Arensburger, A. P., Martin, A. P., Denman, D. W. (1996). Disturbance and patch-specific responses: the interactive effects of woody debris dams on lotic invertebrates. *Oecologia* (105): 247–257 pp. doi: 10.1007/BF00328554.
- Pallarés, S., Arribas, P., Bilton, D. T., Millán, A., Velasco, J., Ribera, I. (2017). The chicken or the egg? Adaptation to desiccation and salinity tolerance in a lineage of water beetles. *Molecular Ecology* 26: 5614–5628 pp <https://doi.org/10.1111/mec.14334>.
- Panzer, R., Stillwaught D., Gnaedinger R., Derkovitz G. (1995). Prevalence of remnant dependence among the prairie and savanna inhabiting insects of the Chicago region. *Natural Areas Journal* 15: 140–143 pp.
- Park, Y., Chonm T., Kwak, I., Lek, S. (2004). Hierarchical community classification and assessment of aquatic ecosystems using artificial neural networks. *Science*

of the Total Environment 327: 105–122 pp. doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.01.014.

- Pentinsaari, M., Hebert, P. D. N., Mutanen, M. (2014). Barcoding beetles: A regional survey of 1872 species reveals high identification success and unusually deep interspecific divergences. PLoS ONE 9 (9), e108651. doi: 0.1371/journal.pone.0108651.
- Perez, M. (1863). Histoire des métamorphoses du *Macronychus quadrituberculatus* et de son parasite. *Annales de la Société Entomologique de France* 3: 621–636 pp.
- Peters, R. H. (1983). *The Ecological Implications of Body Size*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Pons, J., Ribera, I., Bertranpetti, J., Balke, M. (2010). Nucleotide substitution rates for the full set of mitochondrial protein-coding genes in Coleoptera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 796–807 pp. doi: 10.1016/j.ympev.2010.02.007.
- Pons, J-M., Thibault J-C., Aymí, R., Grussu, M., Muntaner, J., Olioso, G., Sunyer, J.R., Touihri, M., Fuchs, J. (2016). The role of western Mediterranean islands in the evolutionary diversification of the spotted flycatcher *Muscicapa striata*, a long-distance migratory passerine species. *Journal of Avian Biology* 47: 386–398 pp. doi: 10.1111/jav.00859.
- Popham, E. J. (1964). The migration of aquatic bugs with special reference to the Corixidae (Hemiptera Heteroptera). *Archiv für Hydrobiologie* (60): 450–496 pp.
- Previšić, A., Walton, C., Kučinić, M., Mitrikeski, P. T., Kerovec, M. (2009). Pleistocene divergence of Dinaric *Drusus* endemics (Trichoptera, Limnephilidae) in multiple microrefugia within the Balkan Peninsula. *Molecular Ecology* 18: 634–647 pp. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.04046.x.
- Puig, M. A. (1983). Distribución y ecología de las especies de Elmidae (Col.; Dryopoidea) de la cuenca del río Llobregat. *Boletín de la Asociación Española de Entomología* 7: 211–219 pp.
- QGIS v2.18.8. QGIS Development Team (2016). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>.
- Raković, M., Neto, J. M., Lopes, R. J., Koblik, E. A., Fadeev, I. V., Lohman, Y. V., Aghayan, S. A., Boano, G., Pavia, M., Perlman, Y., Kiat, Y., Ben Dov, A.,

- Martin Collinson, J., Voelker, G., Drovetski, S. V. (2019). Geographic patterns of mtDNA and Z-linked sequence variation in the Common Chiffchaff and the ‘chiffchaff complex’. PLoS ONE 14 (1): e0210268. doi: 10.1371/journal.pone.0210268.
- Rambaut, A. (2012). Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology: FigTree v. 1.4. <http://tree.bio.ed.ac.uk>
- Ratnasingham, S., Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes* 7: 355–364 pp. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.
- Reisen, W.K. (1977). The ecology of Honey Creek, Oklahoma: downstream drift of three species of aquatic dryopoid beetles (Coleoptera: Dryopoidea). *Entomological News* 88 (7/8): 185–191 pp.
- Rempel, L. L., Richardson, J. S., Healey, M. C. (1999). Flow refugia for benthic macroinvertebrates during flooding of a large river. *Journal of the North American Benthological Society* 18 (1): 34–48 pp.
- Republički Hidrometeorološki Zavod (2015). Hidrološki godišnjak 1. Površinske vode 2014, Beograd.
- Republički Hidrometeorološki Zavod (2016). Hidrološki godišnjak 1. Površinske vode 2015, Beograd.
- Ribera, I., Foster G. (1993). Uso de Coleópteros acuáticos como indicadores biológicos (Coleoptera). *Elytron* 6: 61–75 pp.
- Ribera, I. (2000). Biogeography and conservation of Iberian water beetles. *Biological Conservation* 92: 131–150 pp. doi: 10.1016/S0006-3207(99)00048-8.
- Ribera, I., Vogler, A. (2000). Habitat type as a determinant of species range sizes: the example of lotic-lentic differences in aquatic Coleoptera. *Biological Journal of the Linnean Society* 71: 33–52 pp. doi: 10.1006/bijl.1999.0412.
- Rico, E. (1992). Los Elmidae (Coleoptera: Dryopoidea) de la Península Ibérica e Islas Baleares. Estudio faunístico y análisis de los factores históricos y ecológicos que condicionan su distribución. Tesis Doctoral (Ph. D. Dissertation). Universidad del País Vasco. Leioa. 276 pp.
- Rocchi, S., Terzani, F. (2016). Contributo alla conoscenza della coleotterofauna acquatica dell’Appennino piacentino. (Insecta Coleoptera Gyrinidae, Haliplidae,

- Noteridae, Dytiscidae, Helophoridae, Georissidae, Hydrochidae, Hydrophilidae, Hydraenidae, Scirtidae, Elmidae, Dryopidae, Psephenidae, Chrysomelidae). *Quaderno di Studi e Notizie di Storia Naturale della Romagna* 43: 133–162 pp.
- Rohlf, F. (1990). Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 299–316 pp. doi: 10.1146/annurev.es.21.110190.001503.
- Rohlf, F. J., Marcus, L. F. (1993). A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 129–132 pp. doi: 10.1016/0169-5347(93)90024-J.
- Sadler, J. P., Bell, D., Fowles, A. P. (2004). The hydroecological controls and conservation value of beetles on exposed riverine sediments in England and Wales. *Biological Conservation* 118: 41–56 pp.
- Sánchez-Fernández, D., Abellán, P., Mellado-Díaz, A., Velasco, J., Millán, A. (2006). Are Water Beetles Good Indicators of Biodiversity in Mediterranean Aquatic Ecosystems? The Case of the Segura River Basin (SE Spain). *Biodiversity and Conservation* 15: 4507–4520 pp. doi: 10.1007/s10531-005-5101-x.
- Schmitt, T., Gießl, A., Seitz, A. (2002). Postglacial colonisation of western Central Europe by *Polyommatus coridon* (Poda 1761) (Lepidoptera: Lycaenidae): evidence from population genetics. *Heredity* 88: 26–34 pp. doi: 10.1038/sj.hdy.6800003.
- Schmitt, T. (2007). Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology* 4, 11. doi: 10.1186/1742-9994-4-11.
- Schwind, R. (1991). Polarization vision in aquatic insects and insects living on a moist substrate. *Journal of Comparative Physiology A* (169): 531–540 pp.
- Schwind, R. (1995). Spectral regions in which aquatic insects see reflected polarized light. *Journal of Comparative Physiology A* (177): 439–448 pp.
- Sheffield, N.C., Song, H., Cameron, S.L., Whiting, M.F. (2008). A comparative analysis of mitochondrial genomes in Coleoptera (Arthropoda: Insecta) and genome descriptions of six new beetles. *Molecular Biology and Evolution* 25: 2499–2509 pp. doi: 10.1093/molbev/msn198.
- Sheffield, N.C., Song, H., Cameron, S. L., Whiting, M.F. (2009). Nonstationary evolution and compositional heterogeneity in beetle mitochondrial phylogenomics. *Systematic Biology* 58: 381–394 pp. doi: 10.1093/sysbio/syp037.

- Shepard, W. (2019). Flight Wing Polymorphisms in Elmidae and Dryopidae (Coleoptera: Byrrhoidea). *The Coleopterists Bulletin* 73 (1): 27. doi: 10.1649/0010-065X-73.1.27.
- Short, Z. E. A. (2018). Systematics of aquatic beetles (Coleoptera): current state and future directions. *Systematic Entomology* 43: 1–18 pp. doi: 10.1111/syen.12270.
- Seagle, H. H. (1980). Hight periodicity and emergence patterns in the Elmidae (Coleoptera: Dryopoidea). *Annals of the Entomological Society of America* 73 (3): 300–307 pp.
- Shull, V. L., Vogler, A. P., Baker, M. D., Maddison, D.R., Hammond, P. M. (2001). Sequence alignment of 18S ribosomal RNA and the basal relationships of Adephagan beetles: evidence for monophyly of aquatic families and the placement of Trachypachidae. *Systematic Biology* 50: 945–969 pp.
- Sedell, J. R., Reeves, G. H., Hauer, F., R., Stanford, J.A., Hawkins, C. P. (1990). Role of refugia in recovery from disturbances: Modern fragmented and disconnected river systems. *Environmental Management* 14: 711–724 pp.
- Segura, M. O., Siqueira, T., Fonseca-Gessner, A. A. (2013). Variation in body size of *Phanocerus clavicornis* Sharp, 1882 (Coleoptera: Elmidae: Larinae) in Atlantic Rainforest streams in response to hydraulic disturbance. *Brazilian Journal of Biology* 73: 747–752 pp. doi: 10.1590/S1519-69842013000400010.
- Sibly, R. M., Calow, P. (1989). A life-cycle theory of responses to stress. *Biological Journal of the Linnean Society* 37: 101–116 pp.
- Sih, A. (1981). Stability, prey density and age-dependant interference in an aquatic insect predator, *Notonecta hoffmanni*. *Journal of Animal Ecology* 50: 625–636 pp.
- Song, H., Sheffield, N. C., Cameron, S. L., Miller, K.B. , Whiting, M. F. (2010). When phylogenetic assumptions are violated: the effect of base compositional heterogeneity and among-site rate variation in beetle mitochondrial phylogenomics. *Systematic Entomology* 35, 429–448 pp. doi: 10.1111/j.1365-3113.2009.00517.x

SRPS EN 27828: 2009. Kvalitet vode - Metode uzimanja uzoraka za biološke analize - Smernice za uzimanje uzoraka vodenih makrobeskičmenjaka nastanjenih na dnu pomoću ručnih mreža.

SRPS EN ISO 10870: 2013. Water quality - Guidelines for the selection of sampling methods and devices for benthic macroinvertebrates in fresh waters (ISO 10870: 2012).

SRPS EN 16150: 2013. Water quality - Guidance on pro-rata Multi-Habitat sampling of benthic macro-invertebrates from wadeable rivers.

StatSoft, Inc. (2001). STATISTICA for Windows, version 6.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)

Steedman, R. J. (1983). Life history and feeding role of the xylophagous aquatic beetle, *Lara avara* LeConte (Dryopoidea: Elmidae). MS thesis. Oregon State Univ., Corvallis. 110 pp.

Steffan, A. W. (1958). Die deutschen Arten der Gattungen *Elmis*, *Esolus*, *Oulimnius*, *Riolus*, *Aptyktohallus* (Coleoptera: Dryopoidea). Genitalmorphologisch-taxonomische Studie an Dryopoidea I. *Beiträge zur Entomologie* 8 (1-2): 122–178 pp.

Steffan, A.W. (1961). Vergleichend-mikromorphologische Genitaluntersuchungen zur Klärung der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse der mitteleuropäischen Dryopoidea (Coleoptera). Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere 88 (3): 255–354 pp.

Steffan, A. W. (1963). Beziehungen zwischen Lebensraum und Kiirpergriisse bei mitteleuropäischen Elminthidae (Coleoptera: Dryopoidea). *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere* (53): 1–21 pp.

Stride, G. O. (1955). On the respiration of an aquatic African beetle, *Potamodytes tuberosus* Hinton. *Annals of the Entomological Society of America* 48 (5): 344–351 pp.

Su, J. C., Debinski, D.M., Kajubauskas, M. E., Kindscher, K. (2004). Beyond species richness: community similarity as a measure of cross-taxon congruence for coarse filter conservation. *Conservation Biology* 18 (1): 167–173 pp.

- Suh, A. N., Samways, N. J. (2005). Significance of temporal changes when designing a reservoir for conservation of dragonfly diversity. *Biodiversity and Conservation* (14): 165–178 pp. doi: 10.1007/s10531-005-3652-5.
- Susskind, M. E. C. (1936). A morphological study of the respiratory system in various larval instars of *Stenelmis sulcatus* Blatchley. *Papers of Michigan Academy of Science, Arts and Letters* 21: 697–714 pp.
- Suutari, E., Rantala M. J., Salmela J., Suhonen J. (2004). Intraguild predation and interference competition on the endangered dragonfly *Aeschna viridis*. *Oecologia* (140): 135–139 pp. doi: 10.1007/s00442-004-1559-6.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Sauc, A. G., Cosson J. F (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7 (4): 453–464 pp. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00289.x.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595 pp.
- Tajima, F. (1996). The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics* 143: 1457–1465 pp.
- Tarr, T. L., Baber M. J., Babbitt K. J. (2005). Macroinvertebrate community structure across a wetland hydroperiod gradient in southern New Hampshire, USA. *Wetlands Ecology and Management* (13): 321–334 pp. doi: 10.1007/s11273-004-7525-6.
- Terrab, A., Schönswetter, P., Talavera, S., Vela, E., Stuessy, T. F. (2008). Range-wide phylogeography of *Juniperus thurifera* L., a presumptive keystone species of western Mediterranean vegetation during cold stages of the Pleistocene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 94–102 pp. doi: 10.1016/j.ympev.2008.03.018.
- Ter Braak, C. (1986). Canonical Correspondence Analysis: A New Eigenvector Technique for Multivariate Direct Gradient Analysis. *Ecology* 67: 1167–1179 pp. doi: 10.2307/1938672.
- Ter Braak, C., Prentice, I. (1988). A Theory of Gradient Analysis. *Advances in Ecological Research* 18: 271–317 pp. doi: 10.1016/S0065-2504(08)60183-X.

- Ter Braak, C., Verdonschot, P. (1995). Canonical correspondence analysis and relate multivariate methods in aquatic ecology. *Aquatic Sciences* 57: 255–289 pp. doi: 10.1007/BF00877430.
- Thomson, J. R. (2002). The effects of hydrological disturbance on the densities of macroinvertebrate predators and their prey in a coastal stream. *Freshwater Biology* (47): 1333–1351 pp. doi: 10.1046/j.1365-2427.2002.00863.x.
- Thorpe, W. H., Crisp, D. J. (1949). Studies on plastron respiration. IV. Plastron respiration in the Coleoptera. *Journal of Experimental Biology* 26 (3): 219–260 pp.
- Thorpe, W. H. (1950). Plastron respiration in aquatic insects. *Biological Reviews*: 25: 344–390 pp.
- Timmermans, M. J. T. N., Vogler, A. P. (2012). Phylogenetically informative rearrangements in mitochondrial genomes of Coleoptera, and monophyly of aquatic elateriform beetles (Dryopoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63: 299–304 pp. doi: 10.1016/j.ympev.2011.12.021.
- Tolonen, K.T., Hämäläinen H., Holopainen, I. J., Mikkonen K., Karjalainen J. (2003). Body size and substrate association of littoral insects in relation to vegetation structure. *Hydrobiologia* (499): 179–190 pp. doi: 10.1023/A:1026325432000.
- Townsend, C. R., Hildrew A. G. (1994). Species traits in relation to a habitat templet for river systems. *Freshwater Biology* (31): 265–275 pp. doi: 10.1111/j.1365-2427.1994.tb01740.x.
- Trizzino, M., Jäch, M. A., Audisio P., Alonso, R., Ribera, I. (2012). A molecular phylogeny of the cosmopolitan hyperdiverse genus *Hydraena* (Coleoptera, Hydraenidae). *Systematic Entomology*. doi: 10.1111/j.1365-3113.2012.00654.x.
- Tzedakis, P. C. (2004). The Balkans as prime glacial refugial territory of European temperate trees. In: *Balkan Biodiversity*, Griffiths, H. I., Kryštufek, B., Reed, J. M. (Eds.), Dordrecht, Boston, London: Kluwer, 49–68 pp. doi: 10.1007/978-1-4020-2854-0\_4.
- Wahlberg, N., Saccheri, I. (2007). The effects of Pleistocene glaciations on the phylogeography of *Malitaea cinxia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *European Journal of Entomology* 104: 675–684 pp. doi: 10.14411/eje.2007.085.

- Waters, T. F. (1972). The drift of stream insects. *Annual Review of Entomology* (17): 253–272 pp.
- Weissenberger, J., Spatz, H. C., Emans, A., Schoerbel, J. (1991). Measurement of lift and drag forces in the range experienced by benthic arthropods at velocities below 1.2 m/s. *Freshwater Biology* 25: 21–31 pp. doi: 10.1111/j.1365-2427.1991.tb00469.x
- Wellborn, G. A., Robinson J. V. (1987). Microhabitat selection as an antipredator strategy in the aquatic insect *Pachydiplax longipennis* Burmeister (Odonata, Libellulidae). *Oecologia* 71: 185–189 pp.
- West, L. S. (1929). The behavior of *Macronychus glabratus* Say (Coleopt. Helmidae). *Entomological News* 40 (6): 171–173 pp.
- White, D. S. (1978). Life cycle of the riffle beetle, *Stenelmis sexlineata* (Elmidae). *Annals of the Entomological Society of America* 71 (1): 121–125 pp.
- White, D. S., Brigham, W. U., Doyen, J. T. (1984). Aquatic Coleoptera. In: *An Introduction to the Aquatic Insects of North America*, Merritt, R. W., Cummins, K. W. (Eds.) Dubuque, Iowa: Kendall/Hunt, pp. 361–437.
- White, D. S., Brigham, W. H. (1996). Aquatic Coleoptera. In: *An Introduction to the Aquatic Insects of North America*, Merrit, R. W., Cummins, K.W. (Eds.), 3<sup>rd</sup> edition, 399–473 pp. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa.
- Wiggins, G. B., Mackay R. J., Smith I. M. (1980). Evolutionary and ecological strategies of animals in annual temporary pools. *Archiv für Hydrobiologie. Supplementum* 58: 97–206 pp.
- Williams, D. D. (2006). *The Biology of Temporary Waters*. Oxford University Press, University of Toronto at Scarborough, Canada.
- Wild, A. L., Maddison, D. R. (2008). Evaluating nuclear protein-coding genes for phylogenetic utility in the Coleoptera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 877–891 pp. doi: 10.1016/j.ympev.2008.05.023.
- Winterbottom, J. H., Orton, S. E., Hildrew, A. G., Lancaster, J. (1997). Field experiments on flow refugia in streams. *Freshwater Biology* 37: 569–580 pp. doi: 10.1046/j.1365-2427.1997.00184.x
- Woodward, G., Perkins. D. M., Brown, L. E. (2010). Climate change and freshwater ecosystems: impacts across multiple levels of organization. *Philosophical*

*Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365: 2093–2106 pp.  
doi: 10.1098/rstb.2010.0055.

Van der Kamp, G. (1995). The hydrogeology of springs in relation to the biodiversity of spring fauna: a review. *Journal of the Kansas Entomological Society* 68: 4–17 pp.

Vannote, R. R., Minshall, G. W., Cummins, K.W., Sedell, J. R., Cushing, C. E. (1980). The river continuum concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37 (1): 130–137 pp. doi: 10.1139/f80-017.

Villastrigo, A., Fery, H., Manuel, M., Millán, A., Ribera, I. (2017). Evolution of salinity tolerance in the diving beetle tribe Hygrotini (Coleoptera, Dytiscidae). *Zoologica Scripta* 47 (1): 63–71 pp. doi: 10.1111/zsc.12255.

Vogler, A. (2005). Molecular systematics of Coleoptera: what has been achieved so far? In: *Handbook of Zoology*, Beutel, R. G., Leschen, R. A. B. (Eds.), Vol. IV: Arthropoda: Insecta. Part 38. Coleoptera, Vol. 1: Morphology and Systematics (Archostemata, Adephaga, Myxophaga, Polyphaga (partim) Leschen, pp. 17–22, DeGruyter, Berlin.

XLSTAT (2013). Statistical software for Excel. Free edition. Addinsoft.

Zalom, F. G., Grigarick, A. A., Way, M. O. (1979). Seasonal and diel flight periodicities of rice field Hydrophilidae. *Environmental Entomology* 8: 939–943 pp.

Zalom, F. G., Grigarick, A. A., Way, M. O. (1980). Diel flight periodicities of some Dytiscidae (Coleoptera) associated with California rice paddies. *Ecological Entomology* 5: 183–187 pp. doi: 10.1111/j.1365-2311.1980.tb01140.x.

Živić, I., Marković, Z. (2017). Zoobentos kopnenih voda. Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet, 181 p.

## PRILOG 1

Tabela 1. Izmereni fizičko-hemijski parametri na lokalitetima za morfometrijsku i populacionu analizu elmida

Parametar-jedinica/Lokalitet	Pašna Ravan/Trešnjica	Gornja Trešnjica/Trešnjica	Đakovo/Studenica	Gornjak/Mlava	Plavna/Zamna	Mrtvine/Gaberska Reka	Velika Šnjegotina/Šnjegotina	Novi Grad/Sana	Bijelila/Una	Kozijata nizvodno od Maluše	Sivjak uzvodno od Ezerota
Datum uzorkovanja	20.10.2017.	20.10.2017.	16.06.2011.	04.07.2011.	08.09.2016.	26.10.2015.	28.10.2008.	05.08.2008.	10.07.2015.	11.10.2013.	22.08.2013.
Temperatura vode (°C)	8,3	13,8	16,4	17,3	17,8	9,9	11,6	24,9	10,9	11,1	14,4
Rastvoren O <sub>2</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	9,9	10,1	9,7	9,9	7,6	8,0	12,9	11,4	12,1	9,7	9,6
Zasićenost kiseonikom (%)	84	98	99	106	80	83	122	138	102	88	94
pH	8,14	8,23	8,30	8,10	8,06	7,96	8,10	7,71	8,04	8,70	9,00
Elektroprovodljivost (µS/cm)	323	352	221	423	281	615	172	405	387	350	340
Nitrati (NO <sub>3</sub> -N) (mg l <sup>-1</sup> )	0,40	1,10	0,40	0,40	0,50	0,70	0,28	0,31	0,84	0,62	27,00

Tabela 2. Broj izmerenih jedinki i prosečna dužina tela vrsta roda *Limnius*

Vrsta	Lokalitet/Vodotok	Država/Entitet	Broj analiziranih jedinki	Prosečna dužina tela (mm)
<i>L. opacus</i>	Pašna Ravan/Trešnjica	Srbija	15	2,585
<i>L. opacus</i>	Novi Grad/Sana	Republika Srpska	16	2,107
<i>L. opacus</i>	Velika Šnjegotina/Šnjegotina	Republika Srpska	18	2,250
<i>L. intermedius</i>	Velika Šnjegotina/Šnjegotina	Republika Srpska	20	3,208
<i>L. intermedius</i>	Bijelina/Una	Federacija Bosne i Hercegovine	15	2,697
<i>L. intermedius</i>	Ezeroto/Sivjak	Bugarska	65	2,838
<i>L. volckmari</i>	Pašna Ravan/Trešnjica	Srbija	16	3,569
<i>L. volckmari</i>	Gornja Trešnjica/Trešnjica	Srbija	17	3,174
<i>L. volckmari</i>	Đakovo/Studenica	Srbija	30	2,856
<i>L. volckmari</i>	Gornjak/Mlava	Srbija	35	3,062
<i>L. volckmari</i>	Plavna/Zamna	Srbija	15	3,253
<i>L. volckmari</i>	Mrvine/Gaberska Reka	Srbija	16	2,725
<i>L. volckmari</i>	Novi Grad/Sana	Republika Srpska	18	3,249
<i>L. volckmari</i>	nizvodno od mini hidroelektrane „Maluša”/Kozijata	Bugarska	62	3,092

Tabela 3. Broj izmerenih jedinki i prosečna dužina tela vrsta roda *Elmis*

Vrsta	Lokalitet/Vodotok	Država/Entitet	Broj analiziranih jedinki	Prosečna dužina tela (mm)
<i>E. cf. aenea</i>	Pašna Ravan/Trešnjica	Srbija	15	2,184
<i>E. cf. aenea</i>	Đakovo/Studenica	Srbija	18	2,124
<i>E. cf. aenea</i>	Gornjak/Mlava	Srbija	23	2,242
<i>E. cf. aenea</i>	Novi Grad/Sana	Republika Srpska	28	2,194
<i>E. cf. aenea</i>	Bijelila/Una	Federacija Bosne i Hercegovine	11	2,190
<i>E. cf. maugetii</i>	Gornja Trešnjica/Trešnjica	Srbija	26	2,235
<i>E. cf. maugetii</i>	Đakovo/Studenica	Srbija	55	2,223
<i>E. cf. maugetii</i>	Gornjak/Mlava	Srbija	58	2,040
<i>E. cf. maugetii</i>	Mrtvine/Gaberska Reka	Srbija	12	1,938
<i>E. cf. maugetii</i>	Novi Grad/Sana	Republika Srpska	20	2,060
<i>E. cf. rioloides</i>	Đakovo/Studenica	Srbija	25	1,670
<i>E. cf. rioloides</i>	Gornjak/Mlava	Srbija	30	1,750
<i>E. cf. rioloides</i>	Mrtvine/Gaberska Reka	Srbija	12	1,767

Tabela 4. Prosečne vrednosti analiziranih morfometrijskih karaktera i indeksa vrsta roda *Limnius* (napomena: broj vrste u superskriptu odgovara broju lokaliteta u Tabeli 1, Poglavlje 3.1: Srbija (1-Pašna Ravan/Trešnjica, 2-Gornja Trešnjica/Trešnjica, 3-Đakovo/Studenica, 4-Gornjak/Mlava, 5-Plavna/Zamna, 6-Mrtvine/Gaberska Reka); Bosna i Hercegovina (7-Velika Šnjegotina/Šnjegotina, 8-Novi Grad/Sana, 9-Bijelila/Una); Bugarska (10-Kozijata/nizvodno od hidroelektrane „Maluša”, 11-Ezeroto/Sivjak). Napomena: prosečne vrednosti morfometrijskih indeksa (OD, OP, ODŠ) i prosečna dužina tela (PD) su u tabeli boldovani.

Vrsta	Glava							Pronotum							Abdomen			<b>PD</b>
	DG	ŠG	<b>OD</b>	RO	PO	DA	ŠA	DP	ŠP	<b>OP</b>	DG	ŠG	ŠI	DAB	MŠA	<b>ODŠ</b>		
<i>L.opacus</i> <sup>1</sup>	0,364	0,487	0,747	0,352	0,105	0,667	0,010	0,616	0,839	0,734	0,532	0,490	0,167	1,668	1,099	1,518	2,585	
<i>L.volckmari</i> <sup>1</sup>	0,534	0,654	0,817	0,430	0,190	0,822	0,066	0,800	1,089	0,735	0,702	0,640	0,208	2,199	1,520	1,447	3,569	
<i>L.volckmari</i> <sup>2</sup>	0,522	0,623	0,838	0,401	0,171	0,801	0,057	0,799	0,889	0,899	0,680	0,610	0,181	2,027	1,313	1,544	3,174	
<i>L.volckmari</i> <sup>3</sup>	0,382	0,502	0,761	0,390	0,158	0,707	0,050	0,768	0,877	0,876	0,611	0,552	0,172	1,861	1,195	1,557	2,856	
<i>L.volckmari</i> <sup>4</sup>	0,470	0,572	0,822	0,388	0,165	0,740	0,054	0,781	1,108	0,705	0,652	0,601	0,178	2,096	1,326	1,581	3,062	
<i>L.volckmari</i> <sup>5</sup>	0,570	0,542	1,052	0,397	0,178	0,710	0,060	0,805	1,040	0,774	0,690	0,603	0,190	2,072	1,377	1,505	3,253	
<i>L.volckmari</i> <sup>6</sup>	0,371	0,481	0,771	0,362	0,149	0,682	0,041	0,721	0,828	0,871	0,552	0,508	0,169	1,707	1,061	1,609	2,725	
<i>L.opacus</i> <sup>7</sup>	0,250	0,491	0,509	0,272	0,093	0,724	0,008	0,514	0,868	0,592	0,482	0,452	0,142	1,524	1,132	1,346	2,250	
<i>L.intermedius</i> <sup>7</sup>	0,376	0,552	0,681	0,382	0,177	0,821	0,058	0,814	1,021	0,797	0,675	0,558	0,188	2,080	1,358	1,532	3,208	
<i>L.opacus</i> <sup>8</sup>	0,210	0,352	0,597	0,251	0,083	0,574	0,008	0,422	0,565	0,747	0,402	0,358	0,128	1,084	0,841	1,289	2,107	
<i>L.volckmari</i> <sup>8</sup>	0,575	0,531	1,083	0,381	0,165	0,707	0,062	0,705	0,858	0,822	0,682	0,610	0,181	1,964	1,195	1,644	3,249	
<i>L.intermedius</i> <sup>9</sup>	0,281	0,533	0,527	0,391	0,140	0,754	0,039	0,734	0,931	0,788	0,609	0,566	0,178	1,822	1,159	1,572	2,697	
<i>L.volckmari</i> <sup>10</sup>	0,349	0,591	0,591	0,401	0,172	0,821	0,060	0,791	1,024	0,772	0,552	0,498	0,160	2,007	1,329	1,510	3,092	
<i>L.intermedius</i> <sup>11</sup>	0,210	0,575	0,365	0,404	0,152	0,776	0,043	0,817	1,004	0,814	0,615	0,555	0,182	1,994	1,396	1,428	2,838	

Tabela 5. Prosečne vrednosti analiziranih morfometrijskih karaktera i indeksa vrsta roda *Elmis* (napomena: broj vrste u superskriptu odgovara broju lokaliteta u Tabeli 1, Poglavlje 3.1: Srbija (1-Pašna Ravan/Trešnjica, 2-Gornja Trešnjica/Trešnjica, 3-Đakovo/Studenica, 4-Gornjak/Mlava, 5-Plavna/Zamna, 6-Mrtvine/Gaberska Reka); Bosna i Hercegovina (7-Velika Šnjegotina/Šnjegotina, 8-Novi Grad/Sana, 9-Bijelila/Una); Bugarska (10-Kozijata/nizvodno od hidroelektrane „Maluša”, 11-Ezeroto/Sivijak). Napomena: prosečne vrednosti morfometrijskih indeksa (OD, OP, ODŠ) i prosečna dužina tela (PD) su u tabeli boldovani.

Vrsta	Glava							Pronotum						Abdomen			<b>PD</b>
	DG	ŠG	<b>OD</b>	RO	PO	DA	ŠA	DP	ŠP	<b>OP</b>	DG	ŠG	ŠI	DAB	MŠA	<b>ODŠ</b>	
<i>E. cf. aenea</i> <sup>1</sup>	0,221	0,427	0,518	0,301	0,107	0,800	0,035	0,574	0,779	0,737	0,486	0,463	0,200	1,384	1,104	1,254	2,184
<i>E. cf. maugetii</i> <sup>2</sup>	0,291	0,437	0,666	0,317	0,127	0,720	0,038	0,589	0,752	0,783	0,472	0,501	0,177	1,391	1,009	1,379	2,235
<i>E. cf. aenea</i> <sup>3</sup>	0,163	0,443	0,368	0,318	0,104	0,543	0,045	0,537	0,663	0,810	0,425	0,387	0,154	1,304	1,009	1,292	2,124
<i>E. cf. maugetii</i> <sup>3</sup>	0,294	0,442	0,665	0,282	0,132	0,727	0,042	0,582	0,756	0,770	0,493	0,378	0,186	1,286	1,074	1,197	2,223
<i>E. cf. rioloides</i> <sup>3</sup>	0,122	0,424	0,288	0,247	0,128	0,658	0,037	0,552	0,691	0,799	0,464	0,440	0,148	1,200	0,990	1,212	1,670
<i>E. cf. aenea</i> <sup>4</sup>	0,317	0,461	0,688	0,316	0,140	0,771	0,048	0,591	0,733	0,806	0,451	0,397	0,183	1,360	1,066	1,276	2,242
<i>E. cf. maugetii</i> <sup>4</sup>	0,237	0,458	0,517	0,294	0,114	0,719	0,044	0,530	0,724	0,732	0,454	0,427	0,189	1,361	1,103	1,234	2,040
<i>E. cf. rioloides</i> <sup>4</sup>	0,105	0,445	0,236	0,347	0,118	0,808	0,043	0,658	0,736	0,894	0,502	0,472	0,211	1,266	1,066	1,188	1,750
<i>E. cf. maugetii</i> <sup>6</sup>	0,199	0,384	0,518	0,290	0,110	0,716	0,040	0,490	0,662	0,740	0,460	0,450	0,170	1,240	0,915	1,355	1,938
<i>E. cf. rioloides</i> <sup>6</sup>	0,108	0,420	0,257	0,300	0,101	0,640	0,038	0,558	0,638	0,875	0,480	0,442	0,190	1,203	0,907	1,326	1,767
<i>E. cf. aenea</i> <sup>8</sup>	0,256	0,384	0,666	0,320	0,110	0,639	0,029	0,537	0,689	0,779	0,440	0,380	0,205	1,446	1,028	1,407	2,194
<i>E. cf. maugetii</i> <sup>8</sup>	0,284	0,408	0,696	0,282	0,120	0,682	0,022	0,533	0,624	0,854	0,490	0,510	0,200	1,354	0,956	1,416	2,060
<i>E. cf. aenea</i> <sup>9</sup>	0,320	0,436	0,734	0,291	0,136	0,810	0,040	0,556	0,618	0,900	0,442	0,366	0,171	1,362	0,929	1,466	2,190

## PRILOG 2

Tabela 1. Podaci o jedinkama elmida korišćenim u konstrukciji filogenetskih stabala na osnovu COI-5P gena

Rod	Takson	GenBank Accession#	Država	Izvor
<i>Elmis</i>	<i>Elmis riolooides</i>	KU911664	Italija	BOLD
	<i>Elmis riolooides</i>	KU911664(2)	Italija	BOLD
	<i>Elmis riolooides</i>	KM445562	Nemačka	BOLD
	<i>Elmis riolooides</i>	KU9113227	Italija	BOLD
	<i>Elmis riolooides</i>	KU9113227(2)	Italija	BOLD
	<i>Elmis riolooides</i>	HM376183	Nemačka	BOLD
	<i>Elmis perezi</i>	HF947938	Španija	NCBI
	<i>Elmis aenea</i>	KU914345	Nemačka	BOLD
	<i>Elmis aenea</i>	KU918081	Francuska	BOLD
	<i>Elmis latreillei</i>	HM401281	Nemačka	BOLD
	<i>Elmis rietscheli</i>	HM422035	Nemačka	BOLD
	<i>Elmis obscura</i>	KU918143	Nemačka	BOLD
	<i>Elmis obscura</i>	KU911235	Francuska	BOLD
	<i>Elmis maugetii</i>	KU911322	Nemačka	BOLD

Nastavak tabele 1. Podaci o jedinkama elmida korišćenim u konstrukciji filogenetskih stabala na osnovu COI-5P gena

Rod	Takson	GenBank Accession#	Država	Izvor
<i>Elmis</i>	<i>Elmis maugetii</i>	KU908094	Nemačka	BOLD
	<i>Elmis maugetii</i>	KJ381194	Austrija	NCBI
	<i>Elmis maugetii</i>	KJ381196	Austrija	NCBI
	<i>Elmis</i> sp.	MF458697	Francuska	NCBI
	<i>Elmis</i> sp.	MF458698	Francuska	NCBI
<i>Oulimnius</i>	<i>Oulimnius latiusculus</i>	HM376041	Kanada	BOLD
	<i>Oulimnius rivularis</i>	KM445108	Nemačka	BOLD
	<i>Oulimnius rivularis</i>	KM448490	Nemačka	BOLD
	<i>Oulimnius rivularis</i>	KU913240	Francuska	BOLD
	<i>Oulimnius tuberculatus</i>	KJ966214	Finska	BOLD
	<i>Oulimnius tuberculatus</i>	HM376139	Nemačka	BOLD
	<i>Oulimnius tuberculatus</i>	KU911643	Nemačka	BOLD
<i>Normandia</i>	<i>Normandia nitens</i>	HM401343	Nemačka	BOLD
<i>Esolus</i>	<i>Esolus pygmaeus</i>	HM401310	Nemačka	BOLD
	<i>Esolus pygmaeus</i>	KU916514	Francuska	BOLD
	<i>Esolus pygmaeus</i>	KU919221	Francuska	BOLD
	<i>Esolus parallelepipedus</i>	HQ563114	Nemačka	BOLD
	<i>Esolus parallelepipedus</i>	KM449369	Francuska	BOLD
	<i>Esolus parallelepipedus</i>	HM401309	Nemačka	BOLD

Nastavak tabele 1. Podaci o jedinkama elmida korišćenim u konstrukciji filogenetskih stabala na osnovu COI-5P gena

Rod	Takson	GenBank Accession#	Država	Izvor
<i>Esolus</i>	<i>Esolus angustatus</i>	HM401308	Nemačka	BOLD
	<i>Esolus angustatus</i>	KU915521	Nemačka	BOLD
	<i>Esolus angustatus</i>	HQ563113	Nemačka	BOLD
	<i>Esolus angustatus</i>	KM440186	Nemačka	BOLD
	<i>Esolus angustatus</i>	KU913328	Nemačka	BOLD
<i>Riolus</i>	<i>Riolus subviolaceus</i>	HM401357	Nemačka	BOLD
	<i>Riolus subviolaceus</i>	HM401358	Nemačka	BOLD
	<i>Riolus illiesi</i>	KM444336	Nemačka	BOLD
	<i>Riolus cupreus</i>	HM401355	Nemačka	BOLD
	<i>Riolus cupreus</i>	HM401356	Nemačka	BOLD
<i>Stenelmis</i>	<i>Stenelmis</i> sp.	KR134426	Panama, Srednja Amerika	NCBI
	<i>Stenelmis</i> sp.	KR134429	Panama, Srednja Amerika	NCBI
	<i>Stenelmis</i> sp.	KR134430	Panama, Srednja Amerika	NCBI
	<i>Stenelmis</i> sp.	KR134431	Panama, Srednja Amerika	NCBI
	<i>Stenelmis</i> sp.	XJDQD298-18	Kina	BOLD
	<i>Stenelmis</i> sp.	JF288024	Pensilvanijska, USA	NCBI
	<i>Stenelmis</i> sp.	JF288026	Pensilvanijska, USA	NCBI
	<i>Stenelmis</i> sp.	JF288027	Pensilvanijska, USA	NCBI
	<i>Stenelmis</i> sp.	JF288028	Pensilvanijska, USA	NCBI
	<i>Stenelmis</i> sp.	JF288029	Pensilvanijska, USA	NCBI

Nastavak tabele 1. Podaci o jedinkama elmida korišćenim u konstrukciji filogenetskih stabala na osnovu COI-5P gena

Rod	Takson	GenBank Accession#	Država	Izvor
<i>Stenelmis</i>	<i>Stenelmis</i> sp.	AY165649	Severna Amerika	NCBI
	<i>Stenelmis canaliculata</i>	KM442903	Nemačka	BOLD
	<i>Stenelmis canaliculata</i>	KU912346	Nemačka	BOLD
	<i>Stenelmis sexlineata</i>	ELMID017-07	USA	BOLD
	<i>Stenelmis quadrimaculata</i>	BBCA2845-12	Florida, USA	BOLD
	<i>Stenelmis crenata</i>	BBCA2973-12	Florida, USA	BOLD
	<i>Stenelmis crenata</i>	KR488750	Florida, USA	BOLD
	<i>Stenelmis fuscata</i>	JF288035	Pensilvanijska, USA	BOLD
	<i>Stenelmis fuscata</i>	JF288036	Pensilvanijska, USA	BOLD
	<i>Stenelmis grossa</i>	HQ605036	USA	NCBI
<i>Limnius</i>	<i>Limnius opacus</i>	KM439306	Nemačka	BOLD
	<i>Limnius opacus</i>	KU912153	Nemačka	BOLD
	<i>Limnius opacus</i>	HM401335	Nemačka	BOLD
	<i>Limnius opacus</i>	HM401336	Nemačka	BOLD
	<i>Limnius opacus</i>	MF458748	Francuska	NCBI
	<i>Limnius perrisi</i>	KU907434	Nemačka	NCBI
	<i>Limnius muelleri</i>	KM447490	Francuska	NCBI
	<i>Limnius muelleri</i>	KU916430	Francuska	NCBI
	<i>Limnius muelleri</i>	KM444249	Francuska	NCBI
	<i>Limnius volckmari</i>	KJ962414	Finska	BOLD

Nastavak tabele 1. Podaci o jedinkama elmida korišćenim u konstrukciji filogenetskih stabala na osnovu COI-5P gena

Rod	Takson	GenBank Accession#	Država	Izvor
<i>Limnius</i>	<i>Limnius volckmari</i>	KU914511	Nemačka	BOLD
	<i>Limnius volckmari</i>	KU909552	Francuska	BOLD

Tabela 2. Podaci o uzorcima vrste *Elmis maugetii* korišćeni u prvom setu podataka (ukupno 25 uzoraka, od toga 7 barkodiranih u ovoj studiji). Jedinke iz Holandije, Francuske, Austrije i Nemačke čine severnu populacionu grupu, a jedinke iz Hrvatske, Srbije i Grčke južnu populacionu grupu.

Vrsta	Populaciona grupa	GenBank Accession# / Sample ID	Geografska širina (N)	Geografska dužina (E)	Država	Izvor
<i>Elmis maugetii</i>	severna	KU907029	51.7624	10.9967	Nemačka	NCBI
<i>Elmis maugetii</i>	severna	KU910083	51.7624	10.9967	Nemačka	NCBI
<i>Elmis maugetii</i>	severna	KU911631	50.7813	7.62743	Nemačka	NCBI
<i>Elmis maugetii</i>	severna	KU908250	50.5386	6.9707	Nemačka	NCBI
<i>Elmis maugetii</i>	severna	KU911322	50.9643	10.3644	Nemačka	NCBI
<i>Elmis maugetii</i>	severna	KU908094	50.9643	10.3644	Nemačka	NCBI
<i>Elmis maugetii</i>	severna	HM422008	47.731	11.31	Nemačka	NCBI
<i>Elmis maugetii</i>	severna	HM401302	48.961	11.399	Nemačka	NCBI
<i>Elmis maugetii</i>	severna	HM376142	49.032684	12.65791	Nemačka	NCBI

Nastavak tabele 2. Podaci o uzorcima vrste *Elmis maugetii* korišćeni u prvom setu podataka

Vrsta	Populaciona grupa	GenBank Accession# / Sample ID	Geografska širina (N)	Geografska dužina (E)	Država	Izvor
<i>Elmis maugetii</i>	severna	MF458697	44.389444	5.731389	Francuska	NCBI
<i>Elmis maugetii</i>	severna	MF458698	44.321389	5.78638	Francuska	NCBI
<i>Elmis maugetii</i>	severna	KJ381194	48.446414	15.395811	Austrija	NCBI
<i>Elmis maugetii</i>	severna	KJ381196	48.446414	15.395811	Austrija	NCBI
<i>Elmis maugetii</i>	severna	RMNH.INS.542702	50.846718	5.88484	Holandija	BOLD
<i>Elmis maugetii</i>	severna	RMNH.INS.542701	50.846718	5.88484	Holandija	BOLD
<i>Elmis maugetii</i>	severna	RMNH.INS.542700	50.846718	5.88484	Holandija	BOLD
<i>Elmis maugetii</i>	severna	RMNH.INS.542678	50.846718	5.88484	Holandija	BOLD
<i>Elmis maugetii</i>	severna	RMNH.INS.542677	50.846718	5.88484	Holandija	BOLD
<i>Elmis maugetii</i>	južna	FZ1610	45.55024	17.89949	Hrvatska	sopstveni
<i>Elmis maugetii</i>	južna	FZ1584	44.261111	21.619167	Srbija	sopstveni
<i>Elmis maugetii</i>	južna	FZ1585	44.261111	21.619167	Srbija	sopstveni
<i>Elmis maugetii</i>	južna	FZ1589	43.455023	19.774398	Srbija	sopstveni
<i>Elmis maugetii</i>	južna	FZ1611	43.429444	21.373056	Srbija	sopstveni
<i>Elmis maugetii</i>	južna	FZ1615	41.03843	24.26926	Grčka	sopstveni
<i>Elmis maugetii</i>	južna	FZ1601	41.03843	24.26926	Grčka	sopstveni

Tabela 3. Podaci o uzorcima vrste *Elmis maugetii* korišćeni u drugom setu podataka, genotipizirani sa 3' kraja COI gena (ukupno 42 uzorka; uzete su u obzir sve postojeće sekvene u bazama gena - BOLD i NCBI, za 822-bp fragmenta 3' kraja COI gena).

<b>Podvrsta</b>	<b>GenBank#</b>	<b>Geografska širina (N)</b>	<b>Geografska dužina (E)</b>	<b>Država/Regija</b>	<b>Izvor</b>
<i>E. m. velutina</i>	MF783764	35.176513	-5.309548	Maroko	NCBI
<i>E. m. velutina</i>	MF783765	35.176513	-5.309548	Maroko	NCBI
<i>E. m. velutina</i>	MF783766	35.176513	-5.309548	Maroko	NCBI
<i>E. m. velutina</i>	MF783766	35.177033	-5.140000	Maroko	NCBI
<i>E. m. velutina</i>	MF783766	35.177033	-5.140000	Maroko	NCBI
<i>E. m. velutina</i>	MF783768	35.388777	-5.365827	Maroko	NCBI
<i>E. m. velutina</i>	MF783769	35.177033	-5.140000	Maroko	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783738	36.922551	-3.990437	južna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783738	36.887498	-3.866666	južna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783740	37.237988	-3.971483	južna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783742	37.302882	-3.432437	južna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783742	37.302882	-3.432437	južna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783745	36.887498	-3.866666	južna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783746	36.887498	-3.866666	južna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783748	37.190405	-3.43599	južna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783749	37.190405	-3.43599	južna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783735	43.247137	-4.640032	severna Španija	NCBI

Nastavak tabele 3. Podaci o uzorcima vrste *Elmis maugetii* korišćeni u drugom setu podataka

<b>Podvrsta</b>	<b>GenBank#</b>	<b>Geografska širina (N)</b>	<b>Geografska dužina (E)</b>	<b>Država/Regija</b>	<b>Izvor</b>
<i>E. m. maugetii</i>	MF783735	43.351896	-5.131929	severna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783735	43.279148	-4.482502	severna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783735	43.279148	-4.482502	severna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783735	43.27947	-3.644714	severna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783735	43.27947	-3.644714	severna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783736	43.351896	-5.131929	severna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783736	43.27947	-3.644714	severna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783736	43.214124	-3.810236	severna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783736	43.214124	-3.810236	severna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783737	43.279148	-4.482502	severna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783737	43.05613	-4.226136	severna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783738	43.27947	-3.644714	severna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783738	43.214124	-3.810236	severna Španija	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783759	46.634078	5.813329	Francuska	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783736	49.157525	19.497134	Slovačka	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783750	48.932263	18.931094	Slovačka	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783750	49.23478	18.929019	Slovačka	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783750	49.157525	19.497134	Slovačka	NCBI

Nastavak tabele 3. Podaci o uzorcima vrste *Elmis maugetii* korišćeni u drugom setu podataka

<b>Podvrsta</b>	<b>GenBank#</b>	<b>Geografska širina (N)</b>	<b>Geografska dužina (E)</b>	<b>Država/Regija</b>	<b>Izvor</b>
<i>E. m. maugetii</i>	MF783753	49.039196	19.296051	Slovačka	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783754	49.039196	19.296051	Slovačka	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783755	49.039196	19.296051	Slovačka	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783756	49.157525	19.497134	Slovačka	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783757	49.157525	19.497134	Slovačka	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783757	49.33324	20.13969	Slovačka	NCBI
<i>E. m. maugetii</i>	MF783758	49.33324	20.13969	Slovačka	NCBI

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Boris B. Novaković rođen je 03. avgusta 1982. godine u Valjevu. Srednju školu, Valjevsku gimnaziju, završio je 2001. godine. Iste godine upisao je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Biologija. Diplomirao je u maju 2008. godine, sa prosečnom ocenom 8,62 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Diplomski rad pod naslovom „Monitoring kolonije beloglavog supa *Gyps fulvus* (Hablizl, 1783) u klisuri reke Trešnjice” pod mentorstvom dr Saše Marinkovića i dr Saše Marića uradio je na Katedri za morfologiju, sistematiku i filogeniju životinja. Doktorske studije upisao je 2014. godine na Univerzitetu u Beogradu - Biološkom fakultetu, studijski program Biologija, modul Entomologija. Od 2008. godine zaposlen je kao analitičar za makrozoobentos u Nacionalnoj laboratoriji Republičkog Hidrometeorološkog Zavoda Srbije, a od 2011. godine u istoj laboratoriji u sklopu Agencije za zaštitu životne sredine, Ministarstva zaštite životne sredine u Beogradu. Učestvovao je na 16 terenskih istraživačkih akcija u Srbiji. Do sada je objavio više od 60 naučnih radova i studija iz oblasti hidrobiologije, entomologije i ornitologije; jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu, 6 u međunarodnim časopisima, 30 u domaćim časopisima i 17 kongresnih saopštenja na skupovima međunarodnog značaja. Koautor je dve publikacije o ekološkom statusu vodotokova Srbije. Govori engleski jezik i svira klavir.

**Прилог 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани Борис Новаковић

број индекса Б3051/2014

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

Морфометријска и филогенетска анализа врста фамилије Elmidae (Insecta:

Coleoptera) Балканског полуострва

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Прилог 2.**

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Борис Новаковић

Број индекса Б3051/2014

Студијски програм Биологија

Наслов рада Морфометријска и филогенетска анализа врста фамилије Elmidae

(Insecta: Coleoptera) Балканског полуострва

---

Ментори Проф. др. Ивана Живић и др Влатка Мичетић Станковић

Потписани Борис Новаковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

---

**Прилог 3.**

## **Изјава о коришћењу**

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

Морфометријска и филогенетска анализа врста фамилије Elmidae

---

(Insecta: Coleoptera) Балканског полуострва

---

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

---

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцима, односно лиценцима отвореног кода.