

SRPSKO DRUŠTVO ZA ZAŠTITU VODA

43. konferencija o aktuelnim problemima korišćenja i zaštite voda

# VODA 2014

*The 43<sup>th</sup> Annual Conference of the Serbian Water Pollution Control Society*

*"WATER 2014"*

*Conference Proceedings*



Tara, 3. – 5. jun 2014.



SRPSKO DRUŠTVO ZA ZAŠTITU VODA

*SERBIAN WATER POLLUTION CONTROL SOCIETY*



INŽENJERSKA KOMORA SRBIJE

IZDAVAČ (*PUBLISHER*):

Srpsko društvo za zaštitu voda, Kneza Miloša 9/1, Beograd, Srbija, Tel/Faks: (011) 32 41 656

PROGRAMSKI ODBOR (*PROGRAMME COMMITTEE*):

Prof. dr Branislav ĐORĐEVIĆ, dipl.inž.građ., Beograd  
Prof. dr Božo DALMACIJA, dipl.hem., Novi Sad  
Prof. dr Milan DIMKIĆ, dipl.inž.građ., Beograd  
Prof. dr Violeta CIBULIĆ, dipl.hem., Beograd  
Doc. dr Zorana NAUNOVIĆ, dipl.inž.tehnol., Beograd  
Dr Dubravka REGNER, Naučni savetnik, dipl.biol., Kotor  
Dr Momir PAUNOVIĆ, dipl.biol., Beograd

UREDNIK (*EDITOR*):

Mr Aleksandar ĐUKIĆ, dipl.inž.građ.

*Svi radovi u ovom zborniku radova su recenzirani. Stavovi izneti u ovoj publikaciji ne odražavaju nužno i stavove izdavača, urednika ili programskog odbora.*

TIRAŽ (*CIRCULATION*):

250 primeraka

ŠTAMPA:

"Akademska izdanja", Zemun

CIP - Katalogizacija u publikaciji  
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

502.51(082)  
556.11(082)  
628.3(082)  
628.1(497.11)(082)  
574.5(082)

КОНФЕРЕНЦИЈА о актуелним проблемима коришћења и заштите вода "Вода"  
(43 ; 2014 ; Тара)

Voda 2014 : zbornik radova 43. godišnje konferencije o aktuelnim problemima korišćenja i zaštite voda, Tara, 3.-5. jun 2014. = Water 2014 : Conference Proceedings 43rd Annual Conference of the Serbian Water Pollution Control Society / [organizatori] Srpsko društvo za zaštitu voda u saradnji sa Institutom za vodoprivredu "Jaroslav Černi", Beograd ; [urednik, editor Aleksandar Đukić].- Beograd : Srpsko društvo za zaštitu voda, 2014 (Zemun : Akademska izdanja). - X, 474 str. : ilustr. ; 30 cm

Tekst lat. i ćir. - Tiraž 250. - Str. X: Predgovor / Aleksandar Đukić. – Bibliografija uz svaki rad. - Abstracts.

ISBN 978-86-916753-1-8

1. Српско друштво за заштиту вода (Београд)  
а) Воде - Зборници б) Отпадне воде -  
Зборници с) Снабдевање водом - Србија -  
Зборници д) Хидробиологија - Зборници

COBISS.SR-ID 207401996

**SRPSKO DRUŠTVO ZA ZAŠTITU VODA**

u saradnji sa

**Institutom za vodoprivredu "JAROSLAV ČERNI", Beograd**

ZBORNIK RADOVA

43. GODIŠNJE KONFERENCIJE O AKTUELNIM PROBLEMIMA  
KORIŠĆENJA I ZAŠTITE VODA

# VODA 2014

*43<sup>RD</sup> ANNUAL CONFERENCE OF THE  
SERBIAN WATER POLLUTION CONTROL SOCIETY  
"WATER 2014"  
CONFERENCE PROCEEDINGS*

**Tara, 3. - 5. jun 2014.**



## PRIMENJIVOST MOLEKULARNIH METODA U IDENTIFIKACIJI VRSTA SLATKOVODNIH EKOSISTEMA

Maja Raković, Nataša Popović, Jelena Đuknić, Vesna Đikanović,  
Ana Atanacković, Momir Paunović

*Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Bulevar despota Stefana 142, e-mail: [rakovic.maja@ibiss.bg.ac.rs](mailto:rakovic.maja@ibiss.bg.ac.rs)*

### REZIME

U ovom radu prikazana je primena mitohondrijalnog markera citohrom-oksidaze I kod tri vrste slatkovodnih prilepaka, *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863), *Ferrissia rivularis* (Say 1817) i *Ancylus fluviatilis* (O.F. Müller, 1774), za potrebe procene autohtonog statusa istraživanih vrsta na području Palearktika. Analiza je urađena na osnovu sekvenci COI gena 17 jedinki pomenutih vrsta, preuzetih iz baze podataka „GenBank“. Analize su radene na sekvencama dužine 612 bp. Poređenje je vršeno između jedinki poreklom iz Severne Amerike (nativne za područje) i alohtonih evro-azijskih populacija. Vrsta *Ancylus fluviatilis* je uzeta kao „udaljeni“ (eng. outgroup) takson. Sekvence za analizu preuzete su u FASTA formatu i poravnate su pomoću programa ClustalW, sa već zadatim parametrima. Filogenetske analize su izvršene korišćenjem programa MEGA 6. Za izradu filogenetskih stabala korišćene su dve metode: metoda najbližeg suseda „Neighbour-Joining“ i „Maximum Likelihood“ – metoda maksimalne verovatnoće. Konsenzus stabla iz obe primenjene metode pokazale su da između jedinki severno američke i evro-azijske populacije postoji veliki stepen srodnosti, što potvrđuje hipotezu da su analizirane vrste unete iz Severne Amerike, a da su alohtone za područje Palearktika.

KLJUČNE REČI: molekularne metode, DNK barkoding, identifikacija vrsta, alohtone vrste, genetički diverzitet

## USING MOLECULAR METHODS IN IDENTIFICATION SPECIES OF FRESHWATER ECOSYSTEMS

### ABSTRACT

The paper describes the use of mitochondrial markers cytochrome oxidase I of three freshwater limpet species, *Ferrissia fragilis* ( Tryon , 1863 ) , *Ferrissia rivularis* (Say 1817 ) and *Ancylus fluviatilis* (OF Müller , 1774 ) , for the assessment of the indigenous status of the investigated species in the Palearctic. The analysis is based on COI gene sequences of 17 individuals from above mentioned species, taken from the database "GenBank ". Analyses were performed on sequences of length 612 base pairs (bp). The specimens used in the analysis originated from North America (native for the area) and Eurasia (non`native populations for the area). *Ancylus fluviatilis* was used as outgroup taxon. Sequences were download in FASTA format and aligned using the ClustalW program with predefined parameters. Phylogenetic analyses were conducted using MEGA 6 software. For making phylogenetic trees we used two methods: "Neighbour - Joining" and „Maximum Likelihood“. Consensus trees from both applied methods showed that individuals of North American and Eurasian populations had high degree of similarity, which confirms the hypothesis that analysed species have been introduced from North America and that they are alien for the Palearctic.

KEYWORDS: molecular methods, DNA barcoding, species identification, non-native species, genetic diversity

## UVOD

DNK barkoding je taksonomski metod koji je zasnovan na korišćenju kratkih genetičkih markera DNK koji se koristi za identifikaciju pripadnosti datog uzorka određenoj vrsti. Ovakav pristup se razlikuje od molekularne filogenije, pre svega, što je glavni cilj barkodinga identifikacija nepoznatog uzorka u odnosu na već poznatu klasifikaciju. Sa druge strane, molekularna filogenija opisuje odnose između datih uzoraka u svetlu evolucije. Najčešće korišćen isečak DNK je deo mitohondrijalnog gena citohrom oksidaze I (COI).

Najbolji genetički lokus koji se potencijalno koristi u identifikaciji vrsta treba da ima sledeće osobine: da bude standardizovan, što znači da postoje velike baze deponovanih sekvenci za taj lokus, da bi se dobijeni uzorak mogao uporediti sa velikim brojem drugih uzoraka; da bude prisutan kod većine taksona koji se obrađuju i sekvencioniran bez species-specifičnih PCR prajmera (prajmeri moraju biti univerzalni); da bude dovoljno kratak (maksimum 700 baznih parova) da bi se lako sekvencionirao; da obezbedi veliku genetičku varijabilnost između vrsta, a u isto vreme malu genetičku varijabilnost u okviru vrste. Nekoliko lokusa je preporučeno i izdvajamo sledeće:

- za životinje i mnoge ostale eukariote najbolji je mitohondrijalni COI gen,
- za biljke se koristi kombinacija rbcL i matK hloroplastnih gena i
- za gljive se najčešće koristi internal transcribed spacer (ITS) region.

DNK barkoding se oslanja na relativno jednostavan koncept. Sve ćelije eukariota sadrže mitohondrije, a samim tim i mitohondrijalnu DNK. Mitohondrijalna DNK (mtDNK) ima relativno brzu stopu mutacije, a time je i varijabilnost u mitohondrijalnim sekvencama između vrsta. U okviru COI gena Folmerov region, dužine 658 baznih parova, je predložen kao barkoding gen. Upoređivanjem datog uzorka sa već deponovanim podacima dolazimo do odgovora o sličnosti sekvenci. Baza barkoding uzoraka i gena trenutno sadrži više od 2,000,000 barkoding sekvenci od preko 160,000 vrsta životinja, biljaka i gljiva. Potrebno je voditi računa o tome da se svi mitohondrijalni geni nasleđuju bez rekombinacija, običnim umnožavanjem materinskom linijom, te pojava hibridizacije, horizontalnog transfera gena ili drugih evolucionih „fenomena“ u evolucionoj liniji može dovesti do greške u identifikaciji datog uzorka.

Baze gena, kao recimo GENBANK sadrže mnoge sekvence koje nisu vezane za dokazne primerke (na primer herbarijumske primerke, preparirane životinje, fiksirane školjke i puževe). Ovakav trend može dovesti do pogrešne interpretacije rezultata, ako se sekvence za dati materijal razlikuju dovoljno da bi se opisala nova vrsta. Zbog toga je najbolje sekvencionirati dokazne primerke koji se čuvaju u zbirnama Instituta ili Prirodnjačkih muzeja.

Cilj rada je da se na osnovu odabranih nukleotidnih sekvenci doprinese povećanju preciznijih podataka o identifikaciji vrsta roda *Ferrissia* (filogenetski odnosi u okviru roda *Ferrissia*), a nakon toga da se utvrdi stepen srodnosti native severno-američke populacije sa populacijama u Evroaziji, u cilju potvrde širenja areala visoko invazivne vrste *Ferrissia fragilis* širom ekozone Palearktika (filogeografski odnosi dveju populacija).

## MATERIJAL I METODE

Izolacija DNK iz isečka tkiva vršena je pomoću specijalizovanih kitova, prateći protokol za izolaciju DNA iz životinjskih tkiva. Provera izolacije DNK u smeši sa amplifikacijskim puferom (0,25% brom – fenol plavo, 0,25% ksilen cianol i 30% glicerol), vrši se na 1% agaroznom gelu. Kada utvrdimo koncentraciju izolovane DNK, napravi se radna koncentracija, dodavanjem Sigma vode x 10.

Dobijeno razblaženje se dalje koristi za pripremu PCR reakcije (~ 10 - 50 ng/μl). Lančana reakcija sinteze DNA pomoću DNA polimeraze u in vitro uslovima je metoda za amplifikaciju nukleinskih kiselina, PCR (eng. Polymerase Chain Reaction). Pomoću ove metode može se umnožiti željeni segment DNA u velikom broju kopija. Reakcija teče u tri koraka na različitim temperaturama. U prvom koraku, pri visokoj temperaturi, dolazi do denaturacije dvolančanog molekula DNA datog uzorka. Snižavanjem temperature u drugom koraku, početni oligonukleotidi naležu uz komplementarna mesta na jednolančanom molekulu DNK uzorka. U trećem koraku uz prisustvo enzima polimeraze sintetizuje se komplementarni lanac DNA između početnih oligonukleotida. Nakon završetka PCR reakcije, vrši se provera kvaliteta i dužine PCR produkata na 1,5% agaroznom gelu u 0,5 x TBE pufetu. Dužina fragmenata utvrđuje se korišćenjem markera različite dužine baznih parova, npr od 100 bp ili 1kb. Sekvencioniranje je metoda kojom se utvrđuje redosled nuleotida na fragmentu DNA određene dužine. Za analizu dobijenih sekvenci postoji čitav niz različitih programa, na primer za utvrđivanje grešaka i polimorfnih mesta na 5' - kraju kontrolnog regiona mtDNA (561 bp) može se koristiti program Chromas 2.23 ©Technelysium Pty. Ltd. Upoređivanje dobijenih sekvenci sa sekvencama koje postoje u bazi podataka "GenBank" radi se u programu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) i softverskog paketa MEGA verzija 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.; Tamura i sar., 2013).

Analiza koja je prikazana u ovom radu urađena je na osnovu sekvenci COI gena 17 jedinki vrsta *Ferrissia fragilis*, *Ferrissia rivularis* i *Ancylus fluviatilis*, preuzetih iz internet baze podataka „GenBank“ (www.ncbi.nlm.nih.gov, Tabela 1). Analize su rađene na sekvencama dužine 612 bp. Jedinke za analizu poreklom su sa područja Severne Amerike kao nativne populacije i poredene su sa alohtonim evro-azijskim populacijama (Slika 1). Vrsta *Ancylus fluviatilis* je uzeta kao „udaljen“ (eng. outgroup) takson. Sekvence za analizu preuzete su u FASTA formatu i poravnate su pomoću programa ClustalW sa već zadatim parametrima (Tamura i sar., 2013). Filogenetske analize su izvršene korišćenjem programa MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.; Tamura i sar., 2013).

Za „pravljenje“ filogenetskih stabala najbolje je kombinovati više metoda, kako bi se povećala verodostojnost dobijenih rezultata. U ovom radu su korišćene dve metode molekularne filogenije za dobijanje filogenetskih stabala. Metoda najbližeg suseda „Neighbour-Joining“ – NJ metod (Saitou i Nei, 1987; Felsenstein, 1985; Tamura, 2004, Tamura i sar., 2013) je algoritam za dobijanje razgranatog stabla iz matrice udaljenosti. Druga metoda je „Maximum Likelihood“ (ML metod) – metoda maksimalne verovatnoće (Tamura i Nei, 1993, Felsenstein, 1985, Tamura i sar., 2013) odnosno, metoda koja pokazuje najverovatniji rezultat (stabla) za dati model evolucione promene sleda DNK sekvenci. Program MEGA6, poseduje opciju za testiranje modela koji najviše odgovara ulaznim podacima (NJ metoda). U ovom slučaju to je HKY model (Hasegawa-Kishino-Yano model). Kao rezultat, dobija se stablo koje predstavlja najverovatniji presek više mogućih stabala koja mogu biti konstruisana na osnovu zadatih parametara – konsenzus filogenetsko stablo. Kao test verovatnoće takvog stabla rađena je analiza podrške (eng. bootstrap) (Holmes, 2003). To je statistička metoda koja se često koristi za procenu reproduktivnosti specifičnih karakteristika filogenetskih stabala, odnosno njome procenjujemo pouzdanost pretpostavljenih veza. U ovom slučaju konsenzus stablo (butstrap konsenzus stablo) je izvedeno iz 1000 ponavljanja, odnosno mogućih stabala, a brojevi pored grana predstavljaju procentualne vrednosti podrške ponavljanja grananja.



Slika 1. Lokaliteti uzorkovanih vrsta *Ferrissia fragilis*, *F. rivularis* i *Ancylus fluviatilis*.  
 Figure 1. Localities sampled species *Ferrissia fragilis*, *F. rivularis* and *Ancylus fluviatilis*.

Tabela 1. Pregled analiziranih individua pomoću COI markera.  
 Table 1: Overview of analyzed individuals with COI markers

Redni br.	Ime vrste	Pristupni broj-GenBank	Lokalitet	Klada
1	<i>Ferrissia fragilis</i> (Tryon, 1863)	DQ328263	Michigan	<i>F. fragilis</i> - clade
2	<i>Ferrissia fragilis</i> (Tryon, 1863)	DQ328264	South Carolina	
3	<i>Ferrissia fragilis</i> (Tryon, 1863)	DQ328265	Alabama	
4	<i>Ferrissia fragilis</i> (Tryon, 1863)	DQ328266	Alabama	
5	<i>Ferrissia fragilis</i> (Tryon, 1863)	KF889402	Lebanon	
6	<i>Ferrissia fragilis</i> (Tryon, 1863)	KF889401	Iraq	
7	<i>Ferrissia fragilis</i> (Tryon, 1863)	KF889400	Iraq	
8	<i>Ferrissia fragilis</i> (Tryon, 1863)	DQ452034	Michigan	
9	<i>Ferrissia fragilis</i> (Tryon, 1863)	DQ452033	Poland	
10	<i>Ferrissia fragilis</i> (Tryon, 1863)	DQ452032	Taiwan	
11	<i>Ferrissia fragilis</i> (Tryon, 1863)	DQ452031	Philippines	
12	<i>Ferrissia fragilis</i> (Tryon, 1863)	HQ732257	Italy	
13	<i>Ferrissia fragilis</i> (Tryon, 1863)	HQ732256	Italy	
14	<i>Ferrissia fragilis</i> (Tryon, 1863)	HQ732255	Italy	
15	<i>Ferrissia rivularis</i> (Say, 1817)	DQ328262	Alabama	<i>F. rivularis</i> - clade
16	<i>Ferrissia rivularis</i> (Say, 1817)	GU391063	New York	
17	<i>Ancylus fluviatilis</i> (O.F. Müller, 1774)	DQ328270	Ireland	outgroup

## REZULTATI I DISKUSIJA

Analizom mitohondrijalnog markera citohrom-oksidade I pokazala se jasna izdvojenost prve klade (*F. fragilis* – clade), koja obuhvata populacije *F. fragilis* Severne Amerike zajedno sa svim dostupnim jedinkama evroazijskih populacija (Slika 2 i 3). Druga klada (*F. rivularis* – clade) jasno se odvojila od prve, usled genetske udaljenosti među vrstama *F. fragilis* i *F. rivularis*, sa dobro podržanim čvorovima (Slika 2 i 3). Vrsta *Ancylus fluviatilis* jasno se izdvaja u obe analize i potvrđuje pouzdanost analiza. Rezultati analiziranog markera pokazuju da haplotipovi unutar klade - *F. fragilis* među azijskim, evropskim i američkim populacijama bez većih odvajanja.

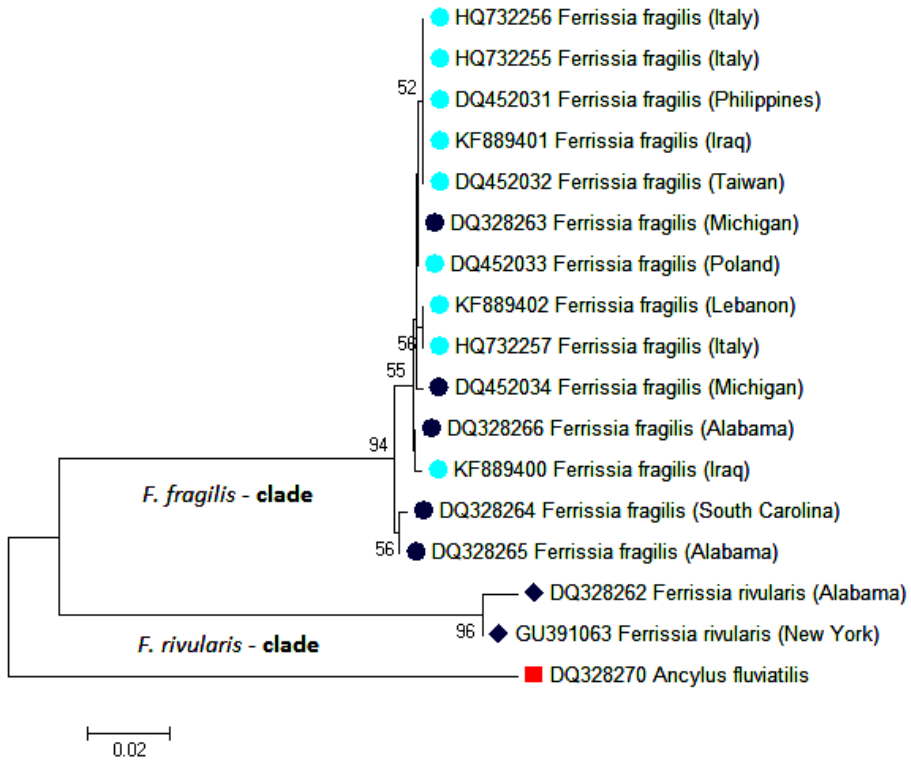
Dobijeni rezultati iz obe analize pokazuju sa su se jedinke prema upoređenim sekvencama pozicionirale gotovo identično u oba stabla, jedino je stepen podrške u čvorovima nešto veći na „Neighbor-Joining“ konsenzus stablu. Osim odvojenih klada koje su zapravo posledica odvajanja dve vrste, i u okviru samih klada postoje manje razlike među analiziranim jedinkama. Unutar klade *F. fragilis* izvaja se šest podklada, odnosno uočavaju se manje razlike među analiziranim jedinkama.

Međutim, kao potvrda o invazivnosti pomenute vrste može se smatrati i to što su jedinke iz severnoameričke populacije u stablu pozicionirane tako da nemaju jasno izdvojenu podkladu, već su u većem ili manjem stepenu srodnosti sa jedinkama evroazijske populacije. Očekivano je bilo da će se druga klada jasno odvojiti, jer se sačinjavaju jedinke druge vrste (*F. rivularis*), ali dobijeni podaci svakako su veoma korisni u cilju dopune podataka o identifikaciji vrsta u okviru samog roda *Ferrissia*, a u okviru koga su vrste veoma slične morfologije i često je tokom istraživanja dolazilo do grešaka u identifikaciji. Među jedinkama druge klade uočava se da postoje manja odvajanja, i ako su obe jedinke sa područja Severne Amerike. Ovaj podatak može se protumačiti i kao potvrda o genetičkom diverzitetu nativne populacije.

Topologija dobijenih stabala za COI marker naglašava molekularnu homogenost evroazijskih haplotipova (Iraq i Lebanon) sa severnoameričkim haplotipovima *Ferrissia fragilis*, čime se obezbeđuje jedan od prvih dokaza o prisustvu ove invazivne vrste na području Bliskog Istoka gde je do sada zabeležena samo autohtona vrsta *F. clessiniana* (Jickeli, 1882),(Walther i sar., 2006).

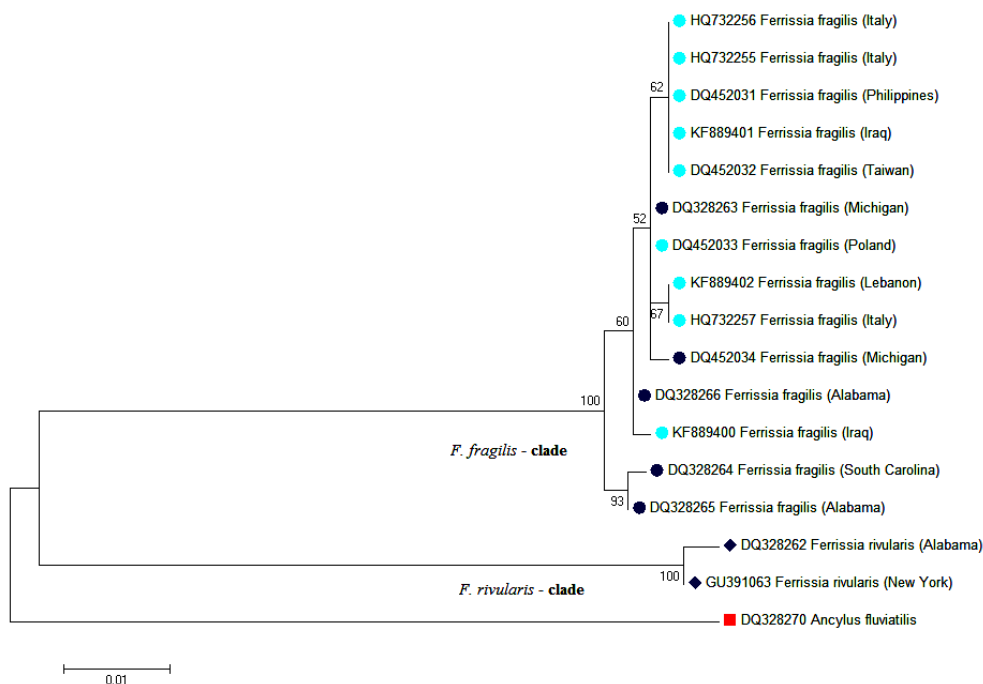
Detaljnim molekularnim analizama populacija vrsta *Ferrissia* sp. zapadnog Palearktika omogućilo bi otkrivanje puta kolonizacije kriptoinvazivne severnoameričke vrste, a do tada se smatra da je put širenja *F. fragilis* Evroazijom potekao od jedne nativne populacije iz Severne Amerike, preko kontinenta zahvaljujući kombinaciji aktivno/pasivnog širenja sa antropogenim pritiskom (Marrone, 2014).

Molekularnom identifikacijom jedinki prikupljenih sa područja Evroazije pokazano je da sve analizirane jedinke pokazuju veliki stepen bliskosti sa severnoameričkom populacijom *Ferrissia fragilis*, pa se mogu smatrati alohtonim za istraživano područje. Nalazi prezentovani u ovom radu, prema Marrone-u (Marrone, 2014), doprinose povećanju sumnje u postojanje autohtone vrste roda *Ferrissia* na području Palearktika, ali pokazuju i neophodnost opisa jedinki na molekularnom nivou i revizije palearktičkih vrsta roda *Ferrissia*.



Slika 2. „Neighbor-Joining“ konsenzus stablo (pun krug - *F. fragilis* - klada; pun romb - *F. rivularis* - klada i pun kvadrat- *Ancyclus fluviatilis* - outgroup)

Figure 2. "Maximum Likelihood" consensus tree (full circle - *F. fragilis* - clade, full rhombus - *F. rivularis* - clade and full square - *Ancyclus fluviatilis* - outgroup)



Slika 3. „Maximum Likelihood“ konsenzus stablo (pun krug - *F. fragilis* - klada; pun romb - *F. rivularis* - klada i pun kvadrat - *Ancylus fluviatilis* - outgroup)  
 Figure 3. "Maximum Likelihood" consensus tree (full circle - *F. fragilis* - clade, full rhombus - *F. rivularis* - clade and full square - *Ancylus fluviatilis* - outgroup)

## ZAKLJUČAK

Za rasvetljavanje filogenetskih odnosa korićene su nukleotidne sekvence gena za citohrom-oksidadu I (COI), na mtDNA, koja kodira podjedinicu I kompleksa citohrom-oksidade c kao dela elektronskog transportnog lanca u procesu oksidativne fosforilacije, i zbog visoke konzerviranosti, ovaj gen se smatra jednim od najkorisnijih molekularno filogenetskih markera. Aminokiselinske sekvence citokrom-oksidade I korisne su za istraživanje davnih evolucionih događaja, jer su aminokiselinske supstitucije retke među vrstama, zato je ovaj region, tzv. barkoding region primenjiv u procesu identifikacije alohtonih vrsta, odnosno preciznije identifikacije vrsta izražene ekoplastičnosti morfologije ljuštura, odnosno utvrđivanje genetičkog diverziteta nativnih populacija. Molekularno-genetičke metode najveću primenu imaju prilikom određivanja konzervacionih jedinica, jer je koncept vrste kao najniže kategorije u pogledu zaštite odavno prevaziđen i nedovoljan sa aspekta genetičkog diverziteta.

## ZAHVALNICA

Istraživanja su ostvarena u okviru projekata OI 176018; TR 37009 i III 43002 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## LITERATURA

- Felsenstein J. (1985): Confidence Limits On Phylogenies: An Approach Using The Bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Holmes, S. (2003): Bootstrapping Phylogenetic Trees: Theory And Methods. *Statistical Science*, 18(2): 241-255.
- Marrone F., Murtada D. Naser, Gh. Yasser Amaal, F. Sacco And M. Arculeo (2014): First Record Of The North American Cryptic Invader *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863) (Mollusca: Gastropoda: Planorbidae) In The Middle East. *Zool. Middle East*, 60(1): 39-45.
- Saitou, N. & M. Nei (1987): The Neighbor-Joining Method: A New Method For Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4): 406-425.
- Tamura K. & Nei M. (1993): Estimation Of The Number Of Nucleotide Substitutions In The Control Region Of Mitochondrial Dna In Humans And Chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, 10:512-526.
- Tamura K., Nei M., & Kumar S. (2004): Prospects For Inferring Very Large Phylogenies By Using The Neighbor-Joining Method. *P. Natl. Acad. Sci. Usa*, 101:11030-11035.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., And Kumar S. (2013): Mega6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30: 2725-2729.
- Walther, A. C., Lee T., Burch, J. B., And Ó Foighil, D. (2006c): Confirmation That The North American Ancyloid *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863) Is A Cryptic Invader Of European And East Asian Freshwater Ecosystems. *J. Mollus. Stud.*, 72: 318-321.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>