

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Tijana Z. Vučić

HIBRIDIZACIJA, MORFOLOŠKA  
VARIJABILNOST I STABILNOST RAZVIĆA  
VELIKIH MRMOLJAKA (*Triturus* spp.)

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Tijana Z. Vučić

HYBRIDIZATION, MORPHOLOGICAL  
VARIABILITY AND DEVELOPMENTAL  
STABILITY OF LARGE-BODIED NEWTS  
(*Triturus* spp.)

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

**Mentorke:**

---

**dr Ana Ivanović**, redovna profesorka

Biološki fakultet

Univerzitet u Beogradu

---

**dr Milena Cvijanović**, viša naučna saradnica

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Univerzitet u Beogradu

**Članice komisije:**

---

**dr Biljana Stojković**, redovna profesorka

Biološki fakultet

Univerzitet u Beogradu

---

**dr Ana Ivanović**, redovna profesorka

Biološki fakultet

Univerzitet u Beogradu

---

**dr Milena Cvijanović**, viša naučna saradnica

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Univerzitet u Beogradu

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

\*\*\*\*\*

*Imala sam posebnu privilegiju da u svim fazama izrade ove disertacije imam nesebičnu pomoć i podršku, kao i izuzetnu posevećenost mojih mentorki dr Ane Ivanović i dr Milene Cvijanović. Hvala vam na posvećenom vremenu (specijalno na onom van radnog vremena, tokom vikenda, odsustva ili odmora), strpljenju, svim razgovorima i savetima (poslovnim i prijateljskim). Hvala na svemu što sam naučila i što ste podelile vaša znanja i iskustva. Posebno hvala dr Ani Ivanović na ukazanom poverenju i datoj slobodi, što me je uvela u istraživanja i omogućila mi da se bavim naukom. Da nije bilo njene ideje i plana, ne bi bilo ni ove disertacije. Takođe, hvala na ustupljenim ilustracijama koje su značajno doprinele izgledu i razumljivosti teze.*

*Hvala profesorki Biljani Stojković na posvećenom vremenu i komentarima koji su značajno doprineli finalnoj verziji ove disertacije.*

*Posebno hvala dr Tanji Vukov i dr Nataši Tomašević Kolarov na pomoći pri fotografisanju ontogenije larvi 2017. godine i na ustupljenim fotografijama iz njihovog eksperimenta. Hvala dr Sonji Nikolić i Jovani Jovanović na pomoći u eksperimentu 2018. godine. Veliku zahvalnost dugujem mnogobrojnim studentima Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu koji su pomagali u tehničkoj realizaciji eksperimenata tokom sve tri godine.*

*Hvala svim koleginicama i kolegama sa projekta što su bili uz mene i od kojih sam mnogo naučila. Hvala na razgovorima, savetima i na veseloj radnoj atmosferi. Čast je biti deo ovakvog tima. Takođe, hvala i koleginicama i kolegama sa Odeljenja za evolucionu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i Instituta za zoologiju Biološkog fakulteta.*

*Gorani, Marku i Aci hvala što su me vodili na terene i olakšali preživljavanje četiri laboratorijska zida. Ani i Gorani na putovanjima, strpljenju za moje probleme, savetima i podršci. Tamari i Marku na razgovorima, podršci i inspiraciji za dalja istraživanja. Maji na daljim istraživanjima i razumevanju za odsustvo proteklih nedelja.*

*Hvala svim mojim Istraživačima, uz koje sam odrastala i stasavala, koji su moju ljubav prema prirodi oblikovali i usmerili u pravom smeru, zbog kojih sam zavolela terene, naučila mnogo toga i stekla nezamenljive prijatelje. Hvala čika Bošku koji nam je to omogućio.*

*Veliko hvala mojim roditeljima i porodici, koji su mi bili ogromna podrška, oslonac i podsticaj kroz sve trenutke u životu, što su mi verovali i ohrabrivali me da donesem prave odluke. Hvala mojim kumovima i prijateljima. Hvala im svima što su tu iako ja nisam bila tu za njih protekle četiri godine. Njima za koje sam najmanje bila tu, porodici i prijateljima, dugujem i najveću zahvalnost.*

\*\*\*\*\*

## Hibridizacija, morfološka varijabilnost i stabilnost razvića velikih mrmoljaka (*Triturus* spp.)

### Sažetak

Hibridizacija može imati različite evolucione i ekološke ishode. Veliki mrmoljci (*Triturus* spp.) formiraju hibridne zone u kojima učestvuju vrste različitog stepena filogenetske srodnosti i predstavljaju pogodan model sistem za ispitivanje procesa i mehanizama hibridizacije i njenih ishoda. Vrste *T. ivanbureschi* i *T. macedoncius* hibridizuju u centralnoj i istočnoj Srbiji formirajući specifičnu zonu u kojoj dolazi do zamene vrsta i asimetrične introgresije mitohondrijske DNK uz postojanje vijabilnih hibridnih populacija. Relativno sličan scenario sreće se u zapadnoj Francuskoj gde *T. cristatus* i *T. marmoratus* hibridizuju i produkuju sterilne hibride.

Ciljevi ove doktorske disertacije su određivanje parametara koji su doprineli formiranju i održavanju hibridne zone, kao i procena uticaja hibridizacije na vijabilitet, morfološku varijabilnost (sa posebnim osvrtom na složeni životni ciklus i metamorfozu) i stabilnost razvića hibrida i roditeljskih vrsta. Podaci su prikupljeni tokom tri godine intra- i interspecijskog eksperimentalnog ukrštanja, kao i analizom materijala iz prirodnih populacija. Praćeni su parametri rane životne istorije, ontogenija i disparitet oblika tela i uticaj hibridizacije na stabilnost razvića. Morfološka varijabilnost i stabilnost razvića procenjeni su metodama geometrijske morfometrije.

*Triturus macedonicus* odlikuje se većim reproduktivnim potencijalom u odnosu na *T. ivanbureschi*, što je moglo da omogući početak širenja areala. Hibridizacija smanjuje vijabilitet jaja, ali ne i embriona. Hibridi se morfološki razlikuju od obe roditeljske vrste i uglavnom su intermedijarni. Larveno razviće je kanalisano, dok su stupnjevi kada jedinke dolaze u kontakt sa novom sredinom (izvaljivanje larvi i metamorfoza) izuzetno varijabilni. Hibridizacija ne utiče na stabilnost razvića velikih mrmoljaka.

**Ključne reči:** hibridizacija, vijabilnost, morfološka varijabilnost, varijansa, morfološki disparitet, ontogenetske trajektorije, metamorfoza, stabilnost razvića, fluktuirajuća asimetrija, *Triturus* spp.

**Naučna oblast:** Biologija

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

## **Hybridization, morphological variability and developmental stability of large-bodied newts (*Triturus* spp.)**

### **Abstract**

Hybridization can have various evolutionary and ecological outcomes. Large-bodied newts (*Triturus* spp.) hybridize mutually regardless of the degree of genetic similarity. This characteristic makes them a good model system to explore hybridization, as well as hybridization outcomes. *Triturus ivanbureschi* and *T. macedonicus* have specific species displacement scenario which includes hybridization in Serbia, wide zone of asymmetric mtDNA introgression and viable hybrid populations. Relatively similar species displacement scenario is found in France, where *T. cristatus* and *T. marmoratus* hybridize, but their hybrids are sterile.

The main aims of this doctoral dissertation are to establish parameters which enabled formation and maintenance of hybrid and introgressive zone and to estimate effects of hybridization on viability, morphological variation (with special emphasis on complex, biphasic life cycle and metamorphosis) and developmental stability. The data was collected during a three-year hybridization experiment, as well as from natural populations. The early life history parameters, ontogeny and disparity of body shape, and the effects of hybridisation on developmental stability were recorded. Morphological variability and developmental stability were analysed by geometric morphometrics.

*Triturus macedonicus* have higher reproductive output compared to *T. ivanbureschi* which could be an advantage at the initial species contact. Hybridization reduces egg viability, but not the viability of embryos. Hybrids are morphologically divergent from parental species, with mostly intermediate position relative to parental species. Larval development is highly canalized, while the ontogenetic stages when newts confront new environment (hatching and metamorphosis) are highly variable. Hybridization does not affect developmental stability.

**Keywords:** hybridisation, viability, morphological variability, variance, morphological disparity, ontogenetic trajectories, metamorphosis, developmental stability, fluctuating asymmetry, *Triturus* spp.

**Scientific field:** Biology

**Special scientific field:** Morphology, systematics and phylogeny of animals

# Sadržaj

---

1	Uvod.....	1
1.1	Hibridizacija.....	1
1.2	Morfološka varijabilnost i stabilnost razvića .....	4
1.2.1	Uloga ontogenije u evoluciji morfoloških osobina .....	4
1.2.2	Kanalisanost i stabilnost razvića kao ontogenetska ograničenja .....	5
1.2.3	Putevi razvića kao preduslov i ograničenje morfološke varijabilnosti.....	7
1.2.4	Morfološka varijabilnost i složeni životni ciklus .....	9
1.2.5	Stabilnost razvića i asimetrija bilateralno simetričnih organizama .....	11
1.3	Veliki mrmoljci (rod <i>Triturus</i> ) .....	13
1.3.1	Opšte karakteristike roda.....	13
1.3.2	Rasprostranjenje velikih mrmoljaka u Srbiji .....	17
1.3.3	Hibridizacija kod velikih mrmoljaka.....	19
2	Ciljevi rada .....	23
3	Materijal i metode .....	24
3.1	Eksperimentalni dizajn.....	24
3.2	Prikupljanje podataka.....	28
3.2.1	Procene reproduktivnog potencijala i karakteristika rane životne istorije .....	28
3.2.2	Analize veličine i oblika, odabir morfoloških struktura, specifičnih tačaka i ontogenetskih stupnjeva .....	30
3.3	Statističke analize.....	40
3.3.1	Analize reproduktivnog potencijala i karakteristika rane životne istorije.....	40
3.3.2	Analize divergencije u veličini i obliku repa larvi .....	40
3.3.3	Analize ontogenetskih putanja larvi i promene oblika glave .....	41
3.3.4	Analize varijabilnosti adultnog glavenog skeleta.....	43
3.3.5	Procena stabilnosti razvića .....	44
4	Rezultati .....	46
4.1	Odlike rane životne istorije .....	46
4.1.1	Reproduktivne karakteristike .....	46

4.1.2	Vijabilitet jaja i embriona, stopa izvaljivanja larvi .....	51
4.1.3	Brzina razvića larvi .....	53
4.2	Morfološka varijabilnost larvi .....	54
4.2.1	Spoljašnja morfologija repa.....	54
4.2.2	Veličina i oblik glave .....	61
4.2.3	Ontogenetski obrasci promene oblika glave .....	64
4.2.4	Ontogenetske trajektorije .....	69
4.3	Morfološka varijabilnost adultnih jedinki .....	71
4.3.1	Oblik glavenog skeleta .....	71
4.3.2	Procena fluktuirajuće asimetrije .....	78
5	Diskusija.....	83
5.1	Reproduktivni potencijal roditeljskih vrsta .....	83
5.1.1	Interspecijske razlike u broju i veličini jaja.....	84
5.1.2	Dodatni faktori koji bi mogli da objasne varijabilnost reproduktivnog potencijala..	85
5.1.3	Dinamika ovipozicije .....	86
5.1.4	Reproduktivni potencijal i scenario zamene vrsta.....	86
5.2	Uticaj hibridizacije na odlike rane životne istorije.....	87
5.3	Uticaj hibridizacije na morfološku varijabilnost larvi velikih mrmoljaka .....	89
5.3.1	Promene u veličini i spoljašnjoj morfologiji repa .....	89
5.3.2	Ontogenija oblika glave velikih mrmoljaka i njihovih hibrida sa posebnim osvrtom na metamorfozu i složeni životni ciklus kao ontogenetsko ograničenje .....	91
5.4	Uticaj hibridizacije na morfološku varijabilnost adulata velikih mrmoljaka .....	97
5.4.1	Oblik kranijalnog skeleta .....	97
5.4.2	Uticaj hibridizacije na stabilnost razvića.....	98
6	Zaključci.....	101
7	Literatura .....	104
8	Prilozi .....	125
9	Biografija autora.....	150



# 1 Uvod

---

## 1.1 Hibridizacija

Hibridizacija se definiše kao reprodukcija članova genetički udaljenih taksona (npr. Barton i Hewitt 1985; Arnold 1992; Abbot i sar. 2013). Prvobitno je smatrano da u prirodi retko dolazi do hibridizacije, i da ukoliko do nje dolazi, ona dovodi do sterilnih hibrida odnosno da nema evolucionog značaja (videti npr. Burke i Arnold 2001; Arnold i sar. 2001). Danas je poznato da se hibridizacija javlja kod najmanje 25% biljnih i 10% životinjskih vrsta u prirodnim populacijama (Mallet 2005). Istraživanjem većeg broja taksona i razvojem novih metoda utvrđeno je da hibridizacija može imati širok spektar kako pozitivnih, tako i negativnih evolucionih i ekoloških ishoda (npr. Seehausen 2004).

Pod terminom hibrid najčešće se podrazumeva jedan, određeni hibridni fenotip. U prirodi je često situacija drugačija i u jednoj populaciji sreće se veći broj hibridnih fenotipova (Barton i Hewitt 1985). Ukrštanjem dve roditeljske jedinke koje pripadaju različitim taksonima formira se  $F_1$  generacija hibrida. Rezultujući fenotip može biti sličan jednom od roditeljskih taksona, nalaziti se između roditelja ili se razlikovati od oba roditelja. Hibridne jedinke mogu dalje da se ukrštaju i produkuju naredne generacije hibrida ili mogu biti sterilne. Može doći i do povratnog ukrštanja hibrida sa jednom ili obe roditeljske vrste (engl. *backcross*), čime postaju genetički sličniji roditeljskoj vrsti sa kojom se ukrštaju. Kod hibridnih jedinki uspostavljaju se nove kombinacije gena čiji se efekti uočavaju na različitim nivoima i imaju različite posledice – od narušavanja stabilnih kompleksa gena i smanjene vijabilnosti hibrida do formiranja novih adaptivnih kombinacija i specijacije (npr. Abbott i sar. 2013). Ishod hibridizacije uglavnom zavisi od nivoa genetičke diferencije roditeljskih taksona, te je za srodnije taksone očekivanije da hibridi budu vijabilni (Nolte i Tautz 2010). Sa druge strane, divergencija i duga nezavisna evolucionarna istorija uz formiranje reproduktivnih barijera, mogu dovesti do potpune reproduktivne izolacije dva taksona (Dobzhansky 1937; Mayr 1963; Coyne i Orr 2004).

Reproduktivne barijere zapravo predstavljaju izolacione mehanizme koji sprečavaju hibridizaciju dva taksona i javljaju se u različitim oblicima. Osnovna podela reproduktivnih barijera je na osnovu perioda u kom se javljaju (pre- i postzigotske barijere). Prezigotske barijere smanjuju verovatnoću parenja ili kontakta gameta dva taksona, ili deluju nakon parenja ili kontakta gameta redukujući verovatnoću uspešnog oplođenja. Postzigotske barijere deluju u smeru redukcije adaptivne vrednosti hibrida. Bilo koji od navedenih izolacionih mehanizama može imati centralu ulogu u omogućavanju divergencije vrsta, ili više njih može delovati zajedno na različitim niovima zavisno od evolucionih mehanizama koji se nalaze u osnovi divergencije (npr. Coyne i Orr 2004). Uticaj hibridizacije na različite karakteristike životne istorije ogleđa se upravo kroz različite reproduktivne barijere, odnosno kroz stepen njihovog uticaja. Kako i ishodi hibridizacije mogu biti različiti, tako može i uticaj hibridizacije na karakteristike životne istorije, od potpunog smanjenja adaptivne vrednosti hibrida (npr. drastično smanjenom stopom izvaljivanja larvi) do više relativne adaptivne vrednosti u odnosu na roditeljske vrste u različitim uslovima životne sredine (npr. Arnold i Hodges 1995; Arnold i Martin 2010).

Kada su izolacioni mehanizmi dva taksona koji dolaze u kontakt nepotpuni, formiraju se hibridne zone. Hjuitt (Hewitt 1988) definiše hibridne zone kao prirodne laboratorije u kojima se mogu izučavati različiti evolucioni procesi, posebno divergencija i specijacija. Pod terminom hibridna zona podrazumeva se jedna ili više klina između dva taksona sa parapatričkim rasprostranjenjem koji međusobno hibridizuju. Drugim rečima, to je uska oblast u kojoj se dva taksona sreću, pare i produkuju hibride (Barton i Hewitt 1985). Nazivaju se i zonama sekundarnog kontakta. Na primer, do diverzifikacije je dolazilo nakon pleistocenskih glacijacija kada je iz refugijuma započeta rekolonizacija u različitim pravcima, što je dovelo do prostorne izolacije populacija i njihove dalje specijacije u različitim sredinskim uslovima (Hewitt 2000). Takođe, zbog različitih geografskih promena u prošlosti (npr. uzdizanja planinskih venaca, stvaranja moreuza, pomeranja toka reka i slično) dolazilo je do prostornog razdvajanja taksona što je vremenom vodilo ka njihovoj divergenciji. Sa promenama uslova, izolovani taksoni mogu doći u ponovni kontakt i hibridizovati (Barton i Hewitt 1985, 1989; Harrison 1993). Hibridne zone se po strukturi

populacije mogu podeliti na unimodalne – kada ih čine pretežno hibridne jedinke, i bimodalne – kada većina jedinki u hibridnoj zoni pripada roditeljskim vrstama (Jiggins i Mallet 2000).

Hibridne zone nisu statične u vremenu i prostoru. Vremenska komponenta se odnosi na dinamiku uspostavljanja sekundarnog kontakta u odnosu na dužinu perioda nezavisne evolucije, dok se prostorna dinamika odnosi na delove areala koji dolaze u kontakt. Upravo ovakva prostorno-vremenska dinamika hibridnih zona omogućava sagledavanje i objašnjenje mehanizama u osnovi evolucionih procesa. Na dinamiku utiče pre svega struktura same zone koja zavisi od stepena genetičke i ekološke diferencijacije taksona koji se ukrštaju, njihove brzine širenja i adaptivne vrednosti hibrida (Harrison 1993; Buggs 2007). Na primer, pomeranje hibridne zone u korist jednog od roditeljskih taksona uslovljeno je asimetričnom hibridizacijom, odnosno povratnim ukrštanjem hibridnih jedinki sa jedinkama favorizovanog roditeljskog taksona (Buggs 2007). Klimatske promene, izmene prirodnog staništa, introdukcija alohtonih, često i invazivnih vrsta, kao i drugi antropogeni uticaji na životnu sredinu, takođe su faktori koji mogu uticati na formiranje i pomeranje hibridnih zona (npr. Arntzen i Hedlund 1990; Allendorf i sar. 2001; Crispo i sar. 2011; Harrison i Larson 2014; Pielt i sar. 2015; Wielstra i sar. 2016).

Da bi se utvrdila dinamika pomeranja hibridne zone, bila su neophodna opsežna, višedecenijska istraživanja prirodnih populacija. Razvoj molekularnih metoda i multidisciplinarni pristup (npr. modelovanje distribucija vrsta) znatno je olakšao utvrđivanje biogeografskih scenarija koji objašnjavaju mehanizme u osnovi formiranja i održavanja hibridnih zona (Buggs 2007; Wielstra 2019). Jedna od opšteprihvaćenih metoda za utvrđivanje prethodnih areala vrsta i potencijalnog ukrštanja u prošlosti jeste genomski otisak, odnosno utvrđivanje introgresije jednog ili više jedarnih markera u istom pravcu (Buggs 2007; Wielstra 2019).

Da bi se u potpunosti objasnila genetička struktura populacija u samim hibridnim zonama i u neposrednoj blizini, kao i biogeografski scenariji koji objašnjavaju procese koji su se događali u prošlosti i doveli do današnjih areala, neophodno je poznavanje biologije i

ekologije roditeljskih taksona i samih hibrida. Važni pokazatelji su reproduktivni potencijal datih grupa i odlike rane životne istorije (npr. vijabilitet jaja, embriona i larvi, stope rasta i razvića). Kao što je već pomenuto, hibridizacija može dovesti do pojave fenotipova koji se u potpunosti razlikuju od roditeljskih vrsta. Da bi se utvrdili mehanizmi koji dovode do divergencije od predačkog programa razvića, evolucije ontogenije i nastanka novih fenotipova, potrebno je uporediti ontogenetske trajektorije roditeljskih vrsta i njihovih hibrida. Takođe, hibridizacija je genetički stresor koji direktno utiče na stabilnost razvića.

## **1.2 Morfološka varijabilnost i stabilnost razvića**

### ***1.2.1 Uloga ontogenije u evoluciji morfoloških osobina***

Jedan od važnih ciljeva u evolucionoj biologiji jeste razumevanje mehanizama i procesa koji generišu morfološku varijabilnost u okviru jedne vrste, kao i među srodnim vrstama. Morfološka varijabilnost je rezultat kompleksnih interakcija između genetičke osnove, odnosno genoma, procesa razvića i sredinskih uticaja na različitim nivoima i u različito vreme tokom individualnog razvića (Wagner i Altenberg 1996; Klingenberg 2002; Hallgrimson i sar. 2014). Istovremeno, kapacitet razvojnog sistema da evoluira je uglavnom funkcija njegove sposobnosti da produkuje varijacije. Različite alternacije tokom ontogenetskih procesa dovode do varijabilnosti unutar populacija i između vrsta. Ta novonastala varijabilnost u okviru jedne populacije je upravo materijal na koji prirodna selekcija može da deluje. Prirodna selekcija zajedno sa dodatnim mehanizmima, kao što su različiti obrasci genetičke kovarijabilnosti ili različita ograničenja (npr. razvojna, funkcionalna, biomehanička), oblikuje morfološku varijabilnost i određuje tok evolucionih promena. Varijabilnost koja se generiše i oblikuje tokom razvića, uslovljena je postojanjem različitih razvojnih ograničenja i pod uticajem je snažne stabilizacione selekcije što rezultuje ograničenim brojem fenotipova koji mogu nastati, pri čemu neki od njih imaju veću učestalost (Hall 1992; Smith i sar. 1995; Reilly i sar. 1997; Klingenberg 1998; Galis i Metz 2007; Hendrikse i sar. 2007; Zelditch i sar. 2012).

Empirijski, varijabilnost se može procenjivati na nivou populacija, između jedinki iste vrste (intraspecijska ili unutargrupna) i između vrsta, odnosno taksona (interspecijska ili međugrupna varijabilnost). Mera unutargrupne varijabilnosti je varijansa i odnosi se na varijabilnost jedinki unutar jedne, homogene populacije, dok se mera međugrupne varijabilnosti označava kao disparitet. Odnosno, kako to navode Zeldičeva i saradnici (Zelditch i sar. 2012), varijansa je komponenta varijabilnosti neophodna za evoluciju, dok je disparitet rezultat evolucionih procesa.

### ***1.2.2 Kanalianost i stabilnost razvića kao ontogenetska ograničenja***

Tendencija razvojnih procesa da prate određene putanje, ublaže i kanališu fenotipsku varijabilnost, postoji uprkos različitim genetičkim i sredinskim uticajima. Ovakva tendencija za suzbijanjem varijabilnosti definiše se kao kanalianost razvića i predstavlja jedno od ontogenetskih ograničenja. Mogućnost organizma da se tokom razvića odupre različitim unutrašnjim (genomskim) i spoljašnjim (sredinskim) stresovima definiše se kao stabilnost razvića. Kanalianost i stabilnost razvića su dve osnovne komponente koje omogućavaju stalnost razvojnih procesa.

Koncept kanalianosti uveden je od strane Vodingtona i Šmaljhuzena (Waddington 1942, 1953; Schmalhausen 1949) da bi se definisala sposobnost organizma da prati određenu, unapred determinisanu razvojnu putanju, uprkos sredinskim i genetičkim smetnjama (Willmore i sar. 2007). Dodatno, po nekim autorima, kanalianost se može razdvojiti na genetičku i sredinsku kanalianost (Wagner i sar. 1997). Pri tome, genetička kanalianost bi se odnosila na sposobnost organizma (njegove genetičke i epigenetičke interakcije) da progresivno sužava moguće fenotipske promene i da održi unapred determinisanu razvojnu putanju uprkos mutacijama (ili, kao u slučaju hibridizacije, narušenim koadaptiranim kompleksima gena), dok bi sredinska kanalianost podrazumevala mogućnost razvojnog procesa da prati određenu putanju bez obzira na sredinske smetnje (npr. različite ekstremne uslove kao što su visoke temperature ili toksične materije). Prema tome, kanalianost predstavlja veoma važan fenomen koji u velikoj meri

određuje nivo fenotipske varijanse, odnosno kanalisanošću dovodi do smanjenja varijanse (Willmore i sar. 2007). Kanalisanošću održava fenotip u opsegu optimalnog. Ukoliko postoji izražena kanalisanošću koja vodi ka određenom fenotipu, može se smatrati faktorom koji ograničava potencijal stvaranja novih fenotipskih varijanti, odnosno evolvabilnost. Pri proceni kanalisanošću razvića koristi se varijansa (unutargrupna varijabilnost). Što je varijansa manja, razviće je više kanalisano (Waddington 1942, 1953, 1957; Wagner i sar. 1997; Zelditch i sar. 2012; Hallgrimson i sar. 2019; Takahashi 2019). Razlike u nivou među-individualne (unutargrupne) varijabilnosti između populacija omogućavaju procenu sposobnosti jedinki da prate unapred definisanu razvojnu putanju pod različitim uslovima sredinskog i/ili genetičkog stresa. Stepem kanalisanošću se empirijski najčešće procenjuje preko nivoa unutargrupne fenotipske varijanse. Pri tome, nivo fenotipske varijanse se može menjati tokom ontogenije odnosno različiti razvojni stupnjevi mogu pokazivati manji ili veći opseg variranja (Willmore i sar. 2007).

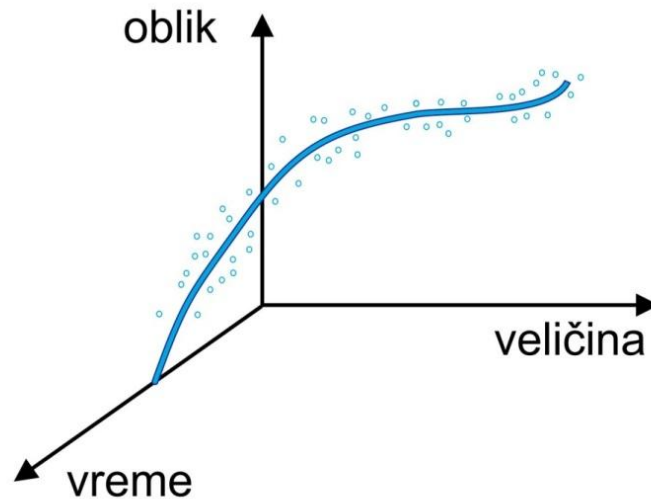
Iako se nalazi u centru interesovanja savremene kvantitativne biologije razvića, postoje kontradiktorne definicije koncepta stabilnosti razvića uključujući i sinonimizaciju sa kanalisanošću razvića (Klingenberg 2019). Najčešće se stabilnost razvića definiše u odnosu na kanalisanošću: dok se kanalisanošću odnosi na puferisanje i amortizaciju spoljašnjih i unutrašnjih faktora koji omogućavaju odvijanje razvojnih procesa bez odstupanja od razvojne putanje koja vodi ka „ciljnom“ fenotipu, razvojna stabilnost se odnosi na mehanizme koji ograničavaju varijacije „ciljnog“ fenotipa pod određenim unutrašnjim (genomskim) i sredinskim uslovima (Klingenberg 2019). Odnosno, stabilnost razvića odražava sposobnost razvojnog sistema za ograničavanjem odstupanja od „ciljnog“ fenotipa za dati genotip, pod datim sredinskim uslovima. Najčešće, stabilnost razvića, odnosno odstupanje od stabilnosti, se procenjuje na osnovu malih, slučajnih odstupanja od idealne simetrije (Van Valen 1962; Palmer i Strobeck 1986; Klingenberg i sar. 2002).

Procena variranja puteva razvića i razvojnih ograničenja među jedinkama, populacijama i srodnim vrstama doprinosi razumevanju i opisivanju procesa koji dovode do morfološke varijabilnosti.

### ***1.2.3 Putevi razvića kao preduslov i ograničenje morfološke varijabilnosti***

Morfološke promene tokom razvića mogu se opisati kao kretanje organizma, ili nekog dela organizma koji se razvija i raste, kroz multidimenzionalni prostor opisan veličinom, oblikom i starošću datog organizma (Slika 1; Alberch i sar. 1979; Klingenberg 2010). Do morfoloških promena i morfoloških razlika unutar ili između taksona dolazi promenama u ontogenetskim trajektorijama (Zelditch i sar. 2003; Mitteroecker i sar. 2004; Adams i Collyer 2009; Collyer i Adams 2013; Smith i sar. 2015a). Poređenje ontogenetskih trajektorija među srodnim vrstama, koje uključuje poređenje vremena dešavanja određenih faza u razviću, stope razvića i morfološki disparitet na svakom ontogenetskom stupnju, omogućava sagledavanje evolucionih mehanizama koji dovode do morfološke divergencije (Klingenberg 1998; Mitteroecker i sar. 2004; Adams i Collyer 2009; Zelditch i sar. 2012; Sheets i Zelditch 2013; Collyer i Adams 2013).

Koncept ontogenetskih trajektorija, njihovog opisa i kvantifikacije, neprekidno se razvija tokom poslednje četiri decenije. Osnovna ideja potekla je od Gulda (Gould 1977), dok su okvir za morfometrijsku kvantifikaciju dali Alberch i saradnici (Alberch i sar. 1979). Ovi autori ontogenetsku trajektoriju definišu kao idealizaciju prema kojoj ontogenija jedinke može biti objašnjena ukoliko se koristi dovoljan broj koordinata koje opisuju veličinu i oblik i koje mogu definisati morfometrijski prostor. U tom morfometrijskom prostoru, populacija je predstavljena skupom tačaka pri čemu svaka tačka (jedinka) prati sopstvenu trajektoriju (Slika 1). Ontogenetska trajektorija zapravo predstavlja razvojnu putanju pod kompleksnom epigenetičkom kontrolom. Glavni problem ovog koncepta koji je nazvan „tradicionalni formalizam“ jeste polazna pretpostavka Alberha i saradnika da do morfoloških promena dolazi na kasnijim stupnjevima razvića (Zelditch i sar. 2012). Bez obzira na dati problem, ovaj koncept predstavlja osnovu za dalja istraživanja morfološke evolucije kao dinamičkog procesa uz smernice za dalje razvijanje analiza ontogenetskih trajektorija.



Slika 1. Prikaz ontogenetske trajektorije u morfološkom prostoru definisanom veličinom, oblikom i vremenom (prema Alberch i sar. 1979).

Istraživanja ontogenetskih trajektorija uglavnom su se odnosila na ispitivanja heterohronije (evolucioni promena u stopama i vremenskim okvirima razvića) i heterohroničnih mehanizama koji dovode do morfološke diverzifikacije. Ostali mehanizmi evolucioni promena su dugo vremena bili zanemarivani, što je često dovodilo do pojednostavljanja objašnjenja evolucije ontogenija (Zelditch i Fink 1996; Hall 1999). Zeldičeva i Fink, na osnovu Guldovih postavki (Gould 1977) razrađuju Hekelovu (Haeckel 1866) ideju i uvode koncept heterotopije – evolucione promene u prostornom oblikovanju razvića (Zelditch i Fink 1996; Zelditch i sar. 2000). Na osnovu međusobnih odnosa i položaja ontogenetskih trajektorija srodnih vrsta u morfološkom prostoru, može se zaključiti u kom delu trajektorije je došlo do divergencije potomačkih trajektorija u odnosu na zajedničku, predačku. Paralelne trajektorije ukazuju da je do razdvajanja došlo na ranijim ontogenetskim stupnjevima. Ukoliko trajektorije imaju zajedničku tačku razdvajanja, do divergencije vrsta je došlo u istom vremenskom trenutku u razviću (npr. na određenom stupnju ili pri određenoj starosti). Dodatno, trajektorije mogu da divergiraju u različitim vremenskim i prostornim tačkama (Mitteroecker i sar. 2004). Pored heterotopije razvijen je čitav niz koncepata koji objašnjavaju promene ontogenetskih putanja (npr.



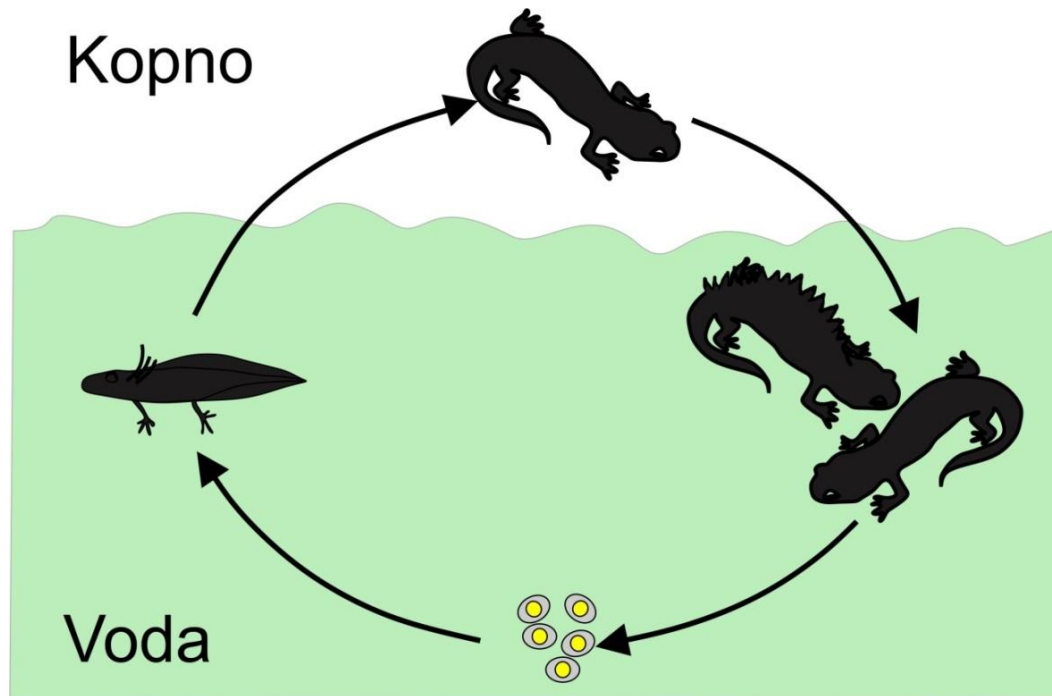
heterotipija, heterometrija, promene obrazaca alometrije). Da bi se testirale hipoteze koje uključuju objašnjenje ontogenetskih promena pomoću bilo kog od datih koncepata, neophodno je kombinovati dva pristupa – dinamičke (trajektorije među ontogenetskim stupnjevima) i statičke karakteristike ontogenije (videti Webster i Zelditch 2005). Statičke komponente variranja podrazumevaju obrasce promene fenotipa, morfološki disparitet i varijansu na svakom od analiziranih stupnjeva (Zelditch i sar. 2012).

#### ***1.2.4 Morfološka varijabilnost i složeni životni ciklus***

Posebno zanimljivo je pitanje morfološke varijabilnosti kod životinja sa složenim, bifazičnim životnim ciklusom kao što su vodozemci (Slika 2). Poznato je da se larve vodozemaca morfološki razlikuju od metamorfoziranih juvenilnih i adultnih jedinki (Duellman i Trueb 1986). Takođe, ekološke preference larvi razlikuju se od preferenci metamorfoziranih, terestričnih jedinki. Akvatične larve i terestrične metamorfozirane jedinke naseljavaju kontrastne životne sredine sa različitim funkcionalnim zahtevima zbog čega su pod različitim selektivnim pritiscima (npr. Moran 1994). Tokom metamorfoze dolazi do dramatičnih promena u morfologiji, fiziologiji i ponašanju. Upravo kompleksnost i brzina promena u formi i funkciji čini metamorfozu interesantnom za studije evolucione biologije razvica.

Tokom metamorfoze vodozemačke larve prolaze kroz morfološke i fiziološke promene koje rezultuju fenotipski drugačijim juvenilnim formama (Duellman i Trueb 1986; Strauss i Altig 1992; Hanken 1992). Repati vodozemci (red Urodela) se po brzini i izražajnosti promena tokom metamorfoze nalaze između žaba (red Anura), koje se karakterišu najizraženijim promenama, i beznogih vodozemaca (red Gymnophiona) koji prolaze kroz najmanje promena. Kod repatih vodozemaca najizraženije morfološke promene uključuju promene u respiratornim, lokomotornim i čulnim strukturama, kao i strukturama vezanim za ishranu. Resorpcija spoljašnjih škrga i zatvaranje škržnih prereza praćene su izmenama u branhijalnoj cirkulaciji. Repno i leđno peraje, koji su razvijeni kod larvi, takođe se resorbuju. Dolazi do promena u strukturi kože i receptora. Pronefrotički

bubrezi smenjuju se sa opisto- ili mezonefortičkim bubrezima uz istovremeno razvijanje gonada i izvodnih kanala. Kranijalni skelet se znatno menja uz resorpciju i transformaciju postojećih, kao i razvoj novih skeletnih elemenata. Promene kranijalnog skeleta paralelne su sa promenama u načinu ishrane i disanja (Duellman i Trueb 1986).



Slika 2. Ilustracija složenog, bifazičnog životnog ciklusa kod vodozemaca na primeru velikih mrmoljaka.

Sa evolucionog stanovišta, kompleksni životni ciklus i metamorfoza smatraju se adaptivnim karakteristikama. Upravo metamorfoza omogućava postojanje morfološki diskretnih fenotipova (videti Moran 1994 i date reference) koji koriste različite resurse: zauzimaju različite ekološke niše i koriste različite izvore hrane (Istock 1967; Moran 1994). Prema adaptivnoj hipotezi, metamorfoza smanjuje konflikt između adaptacija specifičnih za određene stupnjeve i omogućava nezavisnu evoluciju larvenih i metamorfoziranih stupnjeva tokom individualne ontogenije (Moran 1994; Hanken i sar. 1997). Polazeći od prethodnih pretpostavki, Bonet i Bler (Bonett i Blair 2017) ukazuju da neke morfološke celine (npr. oblik tela repatih vodozemaca) ostaju relativno nepromenjene ili visoko integrisane tokom ontogenije, odnosno da tokom metamorfoze ne dolazi do značajnijih

promena u njihovoj strukturi i funkciji. Kod takvih osobina, suprostavljeni zahtevi za ispunjavanje različitih ekološki relevantnih funkcija mogli bi predstavljati ontogenetsko ograničenje. U tom smislu, gubitak metamorfoze, samim tim i kompleksnosti životnog ciklusa, vodio bi povećanju evolvabilnosti date osobine (Bonett i Blair 2017).

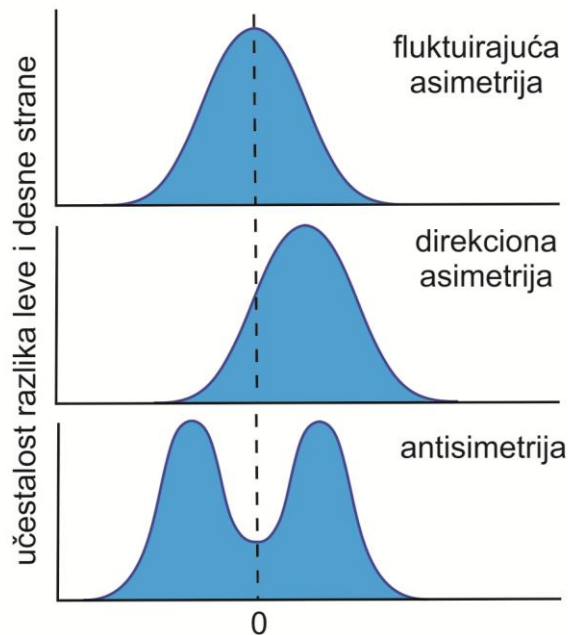
Sa stanovišta morfoloških promena tokom ontogenije jedinke, metamorfoza se može smatrati neophodnim (i kauzalnim) korakom ka adultnom fenotipu (videti Hanken 1989; Moran 1994). Generalno se smatra da globalna integracija razvojnih procesa tokom ranih embrionskih stupnjeva rezultuje konzerviranim ranim stupnjevima ontogenije (Sander 1983; Galis i Metz 2001; Galis i sar. 2018). Slični procesi (apoptoza ćelija, mitozu i organogeneza) koji se dešavaju tokom embrionskog perioda, dešavaju se i tokom metamorfoze. U skladu sa tim, ovi procesi bi trebalo da budu visoko integrisani i kanalisani i tokom metamorfoze. Takođe, pretpostavljeno je da konzervisanost procesa tokom metamorfoze smanjuje disparitet, slično modelu peščanog sata (Ivanović i sar. 2011; Tomašević Kolarov i sar. 2011). Model peščanog sata odnosi se na embrionsko razviće kičmenjaka i objašnjava fon Berovu (Von Baer 1828) pretpostavku da se embrioni razlikuju na početnim i krajnjim stupnjevima, dok su međusobno veoma slični tokom središnjeg perioda organogeneze (Von Baer 1828; Gould 1977; Duboule 1994; Raff 1996; Richardson 1999; pogledati i Bininda-Emonds i sar. 2002). Visoka konzerviranost ovog, takozvanog, „filotipskog stupnja“ ili „filotipskog perioda“ objašnjava se globalnom integracijom razvojnih procesa (Sander 1983; Raff 1996). U datom periodu posledice odstupanja od „očekivanog“ fenotipa su ozbiljnije čak i letalne u odnosu na druge periode organogeneze. Tokom kasnijih perioda organogeneze, modularnost je izraženija što omogućava fenotipske promene i divergenciju ontogenetskih trajektorija (Atkinson 1992; Hall 1992, 1996; Raff 1996; Galis i Metz 2001).

### ***1.2.5 Stabilnost razvića i asimetrija bilateralno simetričnih organizama***

Kao što je prethodno navedeno, jedna od dve glavne komponente koje održavaju postojanost puteva razvića jeste stabilnost razvića, odnosno kapacitet organizma da

produkuje određeni, optimalni fenotip bez obzira na uticaj različitih promena koje se dešavaju tokom razvića. Do tih promena dolazi pod uticajem različitih stresora. Spoljašnji, sredinski stresori podrazumevaju promene u životnoj sredini koje mogu imati negativan uticaj na rast i razviće (npr. nedostatak vode ili hrane, neodgovarajuća temperatura, fragmentacija staništa). Do unutrašnjeg, genetičkog, odnosno genetskog stresa može doći usled inbridinga, introgresije ili hibridizacije (Parsons 1990; Graham 1992; Clarke 1993; Klingenberg i McIntyre 1998; Auffray i sar. 1999).

Kao empirijska mera nestabilnosti razvića koristi se fluktuirajuća asimetrija, odnosno male nasumične promene („šumovi“) leve i desne strane bilateralno simetričnih organizama. Kod idealno simetričnih organizama, oblik i veličina leve i desne strane bi bile identične, odnosno njihova razlika bila bi jednaka nuli, a svako odstupanje od idealne simetrije se definiše kao asimetrija. Na osnovu raspodele srednjih vrednosti i varijansi razlika u veličini i obliku leve i desne strane morfološke celine, asimetrija može da bude: fluktuirajuća, direkcionalna i antisimetrija (Van Valen 1962; Palmer i Strobeck 1986; Klingenberg i sar. 2002; Graham i sar. 2010; Klingenberg 2015). Fluktuirajuća asimetrija (FA) označava slučajna, mala odstupanja u obliku i/ili veličini leve i desne strane morfološke celine. Polazna pretpostavka je da su obe strane imale istu genetičku osnovu, kao i da se njihovo razviće odvijalo pod identičnim uslovima životne sredine. Fluktuirajuća asimetrija ima normalnu raspodelu i srednju vrednost koja je jednaka nuli. Direkcionalna asimetrija takođe ima normalnu raspodelu, ali je jedna strana uvek veća od druge i javlja se kada postoji genetički determinisana tendencija da se leva ili desna strana morfološke celine razlikuje u veličini i/ili obliku. Antisimetrija ima bimodalnu raspodelu i karakteristična je za populacije u kojima su većina ili sve jedinke asimetrične i najčešće nema genetičku osnovu. Prema tome, tipovi asimetrije imaju različito biološko poreklo i implikacije i predstavljaju manifestacije bioloških procesa koji se dešavaju u organizmu (Slika 3).



Slika 3. Tipovi asimetrije kod bilateralno simetričnih organizama. Raspodela srednjih vrednosti i varijansi razlika u veličini i/ili obliku leve i desne strane morfološke celine.

### 1.3 Veliki mrmoljci (rod *Triturus*)

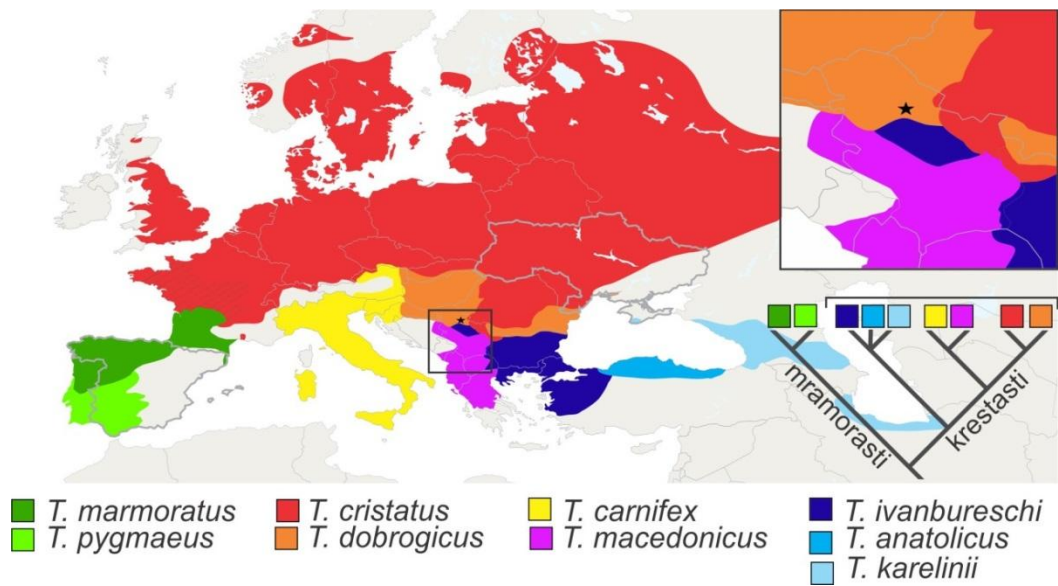
#### 1.3.1 Opšte karakteristike roda

Veliki mrmoljci pripadaju rodu *Triturus* Rafinesque, 1815 (Amphibia, Caudata (Urodela), Salamandridae). Naseljavaju bare, jezera i slična akvatična staništa tokom proleća i leta (tri do šest meseci), nakon čega se povlače u okolna vlažna skrovišta gde i prezimljavaju u hibernaciji (Duellman i Trueb 1986). Striktno su oviparni i sve vrste imaju slično reproduktivno ponašanje kao i odlike životne istorije (Duellman i Trueb 1986). Ženke ulažu značajno vreme i energiju u produkciju i polaganje jaja. Složeno reproduktivno ponašanje sa odsustvom amplexusa javlja se na početku akvatičnog perioda. Mužjaci nakon ritualnog „svadbenog plesa” deponuju spermatofores koje ženke prikupljaju kloakom. Nakon unutrašnje fertilizacije, ženke polažu 200 do 400 jaja (Griffiths i Teunis

1996) koja pojedinačno umotavaju u listove biljaka podvodne vegetacije. Ovipozicija traje nekoliko nedelja (Duellman i Trueb 1986; Díaz-Paniagua 1989; Arntzen i Hedlund 1990; Miaud 1994, 1995; Orizaola i Braña 2003). Smatra se da ovakvo specifično ponašanje tokom polaganja jaja omogućava zaštitu jaja od predacije, mehaničkih oštećenja i negativnih efekata UV zračenja (npr. Miaud 1993, 1994; Marco i sar. 2001). Jaja su zaštićena želatinoznim omotačem (galertom) (Duellman i Trueb 1986). Veličina jaja je specifična za vrste (Furtula i sar. 2009) i ima uticaja na embrionsko razviće i rast larvi (Berven i Chadra 1988; Loman 2002).

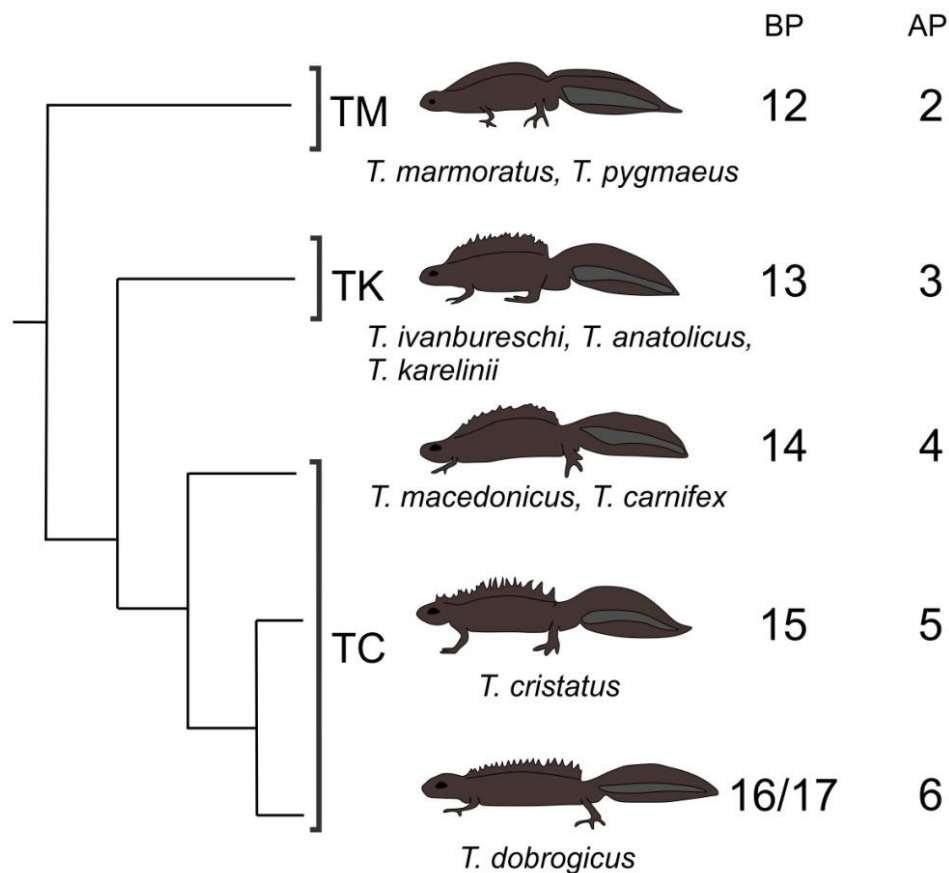
Jedna od karakteristika koja se javlja kod svih predstavnika roda *Triturus* jeste letalni heteromorfizam hromozoma 1 (balansni letalni sindrom). Sve adultne jedinke poseduju dva tipa hromozoma 1. Homozigotni embrioni kod kojih se javljaju dve kopije bilo kog tipa hromozoma 1 usporavaju razviće tokom embriogeneze i uginu. Kao posledica letalnog sindroma samo se 50% embriona razvija do izvaljivanja iz galertne kapsule (npr. Macgregor i Horner 1980). Larve posle nekoliko meseci metamorfoziraju i juvenilne jedinke prezimljavaju na kopnu (Duellman i Trueb 1986).

*Triturus* je monofiletski rod koji se odlikuje rapidnom adaptivnom radijacijom. Pretpostavljena starost roda je oko 24 miliona godina (Steinfartz i sar. 2007; Ivanović i Arntzen 2014) i sačinjava ga devet vrsta grupisanih u tri osnovne klade: 1) *T. marmoratus* grupa (*T. marmoratus*, *T. pygmaeus*) – TM, 2) *T. cristatus* grupa (*T. cristatus*, *T. carnifex*, *T. macedonicus*, *T. dobrogicus*) – TC i 3) *T. karelinii* grupa (*T. karelinii*, *T. anatolicus*, *T. ivanbureschi*) – TK. Klade TC i TK čine grupu krestastih mrmoljaka (*Triturus cristatus* superspecies), dok je klada TM predstavljena mramorastim mrmoljcima (Slike 4 i 5).



Slika 4. Mapa rasprostranjenja i filogenetsko stablo velikih mrmoljaka u Evropi i Srbiji (izdvojeni kvadrat).

Biogeografski raspored velikih mrmoljaka odražava generalnu sliku pleistocenskih refugijuma i postglacijalne ekspanzije (Wielstra i sar. 2014a). Areali vrsta su uglavnom jasno razdvojeni, mada dolazi do preklapanja gde se javljaju kontaktne i hibridne zone (Arntzen i sar. 2014; Wielstra i sar. 2014b; za detalje o taksonomiji i biogeografiji pogledati Priloge 1 i 2). Devet vrsta velikih mrmoljaka može se grupisati u pet eko-morfoloških grupa koji se karakterišu razlikama u broju presakralnih, trupnih pršljenova, kao i u broju meseci koje provode u vodi (Slika 5). Dakle, oblik tela je visoko korelisan sa ekologijom vrste, sa gradijentom od pretežno terestričnih (kraće i snažnije telo, manji broj pršljenova) do pretežno akvatičnih vrsta (izduženo, vitko telo, veći broj pršljenova) (Arntzen i Wallis 1999; Arntzen 2003; Slijepčević i sar. 2015; Wielstra i sar. 2019).



Slika 5. Pikaz pet eko-morfoloških grupa velikih mrmoljaka i njihovih međusobnih filogenetskih odnosa. Skraćenice: BP – broj trupnih pršljenova; AP – akvatični period, odnosno broj meseci provedenih u vodi tokom godine (prema Wielstra i sar. 2019).

Morfološke razlike među vrstama velikih mrmoljaka kod adultnih jedinki ogledaju se u obliku tela (Vukov i sar. 2011; Ivanović i Arntzen 2014), aksijalnom skeletu (Arntzen i sar. 2015; Slijepčević i sar. 2015), obliku i veličini pršljena (Ratnikov i Litvinchuk 2007, 2009; Urošević i sar. 2016; Govedarica i sar. 2017), skeletu ekstremiteta (Ivanović i sar. 2008a; Tomašević Kolarov i sar. 2011), kranijalnom skeletu i obliku glave (Ivanović i sar. 2007, 2008b, 2013; Cvijanović i sar. 2014), kao i u obrascima obojenosti (Arntzen i Wallis 1999; Arntzen 2003). Pored jasne diferencijacije na adultnim stupnjevima, utvrđene su i



razlike na larvenim stupnjevima (Litvinchuk i Borkin 2009; Ivanović i sar. 2011; Cvijanović i sar. 2015).

Veliki mrmoljci su često korišćeni kao model sistemi za različita evolucionarna i ekološka istraživanja, te je tokom godina prikupljen veliki broj podataka o njihovoj morfologiji, ponašanju, životnoj istoriji, rasprostranjenju i filogeniji. Zbog rapidne radijacije i politomije, kao i introgresije i hibridizacije među vrstama, najveći izazov za istraživače predstavljala su filogenetska i taksonomska istraživanja, pre svega utvrđivanje tačnog redosleda grananja, kao i utvrđivanje tačnog broja vrsta (posebno zbog morfološke kriptičnosti sestrinskih vrsta).

### **1.3.2 Rasprostranjenje velikih mrmoljaka u Srbiji**

Balkansko poluostrvo se dugo smatralo centrom diverziteta velikih mrmoljaka (Crnobrnja–Isailović i sar. 1997). U Srbiji se susreću četiri vrste: *T. cristatus* (običan veliki mrmoljak), *T. macedonicus* (istočni glavati veliki mrmoljak), *T. ivanbureschi* (Burešov dugonogi mrmoljak) i *T. dobrogicus* (podunavski veliki mrmoljak). Najveći problem u određivanju rasprostranjenja predstavljali su neraščišćeni filogenetski i taksonomski odnosi unutar grupe velikih mrmoljaka. Areal velikih mrmoljaka u Srbiji obuhvata panonsku, peripanonsku i planinsko-kotlinsku oblast, odnosno celo područje Srbije. Prvenstveno se nalaze u nizijskim i brežuljkastim područjima – 60% ukupnog broja nalazišta je do 300 m nadmorske visine (Džukić i sar. 2016).

Areal *T. cristatus* u Srbiji obuhvata Negotinsku krajinu (Jabukovac, Štubik i bližu okolinu Negotina, planinu Miroč i moguće je da se širi do Ključa i okoline Knjaževca) i Vršачke planine sa okolinom (Česta, Široko bilo, Kokarna, Vršачki rit, Vatin, Mesić, Kusić, Kruščica, Kaluđerovo). Zapadnu granicu areala čine nalazišta Klokočevac, Plavna i Bor. Južna granica nije precizno određena ali se pretpostavlja da su to potencijalna nalazišta u okolini Minićeva (Trnovac i Drenovac). Istočnu granicu areala činila je državna granica sa Bugarskom i obronci Stare planine. Međutim, u severozapadnoj Bugarskoj je zabeležen veći broj nalaza koji se nadovezuju na utvrđeno rasprostranjenje u Srbiji, tako da ako se

uzme u obzir celokupan areal vrste, areal vrste u Srbiji i Bugarskoj predstavlja krajnju južnu granicu. Sva dosadašnja nalazišta u Srbiji su locirana ispod 500 m nadmorske visine, odnosno karakteristična su za nizije, ravnice i brežuljkaste predele (Džukić i sar. 2016).

Poteškoće u određivanju areala *T. macedonicus* u Srbiji posledica su komplikovanih odnosa unutar grupe velikih mrmoljaka. Nalazišta koja predstavljaju istočnu granicu areala su: Gnjlane, Novo Brdo, Smeteško jezero, Radošiće, Jošanička banja, Studenica, Kraljevo, Mrsac, Rakari, Bukovac i Petnica. Status populacija nije jasan u Tamnavi, Jadru, Pocerini i Mačvi. Deo opšteg areala u Srbiji povezan je sa južnim delovima areala u Makedoniji, Grčkoj i Albaniji, uz mogućnost da postoji direktna veza preko Šar-planine i Prokletija. Prosečna nadmorska visina nalazišta u Srbiji je 566 m nadmorske visine, odnosno *T. macedonicus* predstavlja brdsko-planinsku vrstu (Džukić i sar. 2016).

Početak 20. veka smatrano je da je *T. ivanbureschi* (tada podvrsta *T. cristatus karelinii*) najšire rasprostranjen veliki mrmoljak na području bivše Jugoslavije. Sredinom 20. veka do osamdesetih godina smatrano je da je takson ograničen samo na jugoistočni deo ovog područja ili na sam istok Balkanskog poluostrva. Od kraja osamdesetih godina do danas, utvrđeno je da je areal značajno uži. Jedan od problema tačnog određenja areala je hibridizacija sa *T. macedonicus*. Naime, *T. macedonicus* je širenjem svog areala presekao areal *T. ivanbureschi* tako da se javlja izolovana severna enklava. Zapadna granica severnog areala počinje između Debrca i Ostružnice, ka jugu se verovatno proteže između Čibutkvice i Bukulje, potom između Gornjeg Milanovca i Kragujevca, gde dolazi u kontakt sa *T. dobrogicus* i *T. macedonicus*. Južni deo disjunktne areala nalazi se na jugoistočnom delu Srbije uz granice sa Bugarskom i Makedonijom. Po visinskoj distribuciji u Srbiji *T. ivanbureschi* pripada brdsko-planinskim vrstama sa srednjom visinom nalazišta od 459 metara nadmorske visine (Wielstra i Arntzen 2014; Džukić i sar. 2016; Wielstra i sar. 2017).

Najmanje problema oko rasprostranjenja nalazi se kod *T. dobrogicus* čiji je areal vezan za Podunavlje. Obuhvata panonsku i delom peripanonsku Srbiju, lokalnu pojavu u zoni Đerdapa i moguće simpatričko javljanje sa *T. cristatus* u oblasti Ključa i Krajine.

Severne, zapadne i istočne granice areala uglavnom se podudaraju sa državnim granicama. U južnom delu areala, severno od Save i Dunava, dolazi do kontakta sa preostale tri vrste velikih mrmoljaka, gde se javlja problem razgraničenja. Prosečna nadmorska visina nalazišta *T. dobrogicus* je 85,5 m, te se smatra nizijskom formom. Granica prostiranja u Srbiji je 200 m nadmorske visine na koju se nastavlja zona kontakta sa drugim vrstama (Džukić i sar. 2016).

Distribucija velikih mrmoljaka u Srbiji je parapatrička. U zonama kontakta dolazi do hibridizacije. Takođe, javlja se i asimetrična introgresija mitohondrijske DNK među vrstama koja ukazuje na promene areala tokom prošlosti odnosno na širenje areala jedne vrste na račun druge. Opisano je šest kontaktnih zona velikih mrmoljaka u Srbiji i to: *T. cristatus* i *T. ivanbureschi* (Arntzen i sar. 2014; Džukić i sar 2016.), *T. cristatus* i *T. macedonicus* (Arntzen i Wallis 1999; Arntzen i sar. 2014), *T. cristatus* i *T. dobrogicus* (Džukić i sar. 2016), *T. dobrogicus* i *T. ivanbureschi* (Arntzen i sar. 2014; Džukić i sar. 2016), *T. dobrogicus* i *T. macedonicus* (Wallis i Arntzen 1989; Arntzen i sar. 2014) i *T. ivanbureschi* i *T. macedonicus* (Wallis i Arntzen 1989; Arntzen i Wallis 1999; Wielstra i Arntzen 2012, 2014; Wielstra i sar. 2017).

### **1.3.3 Hibridizacija kod velikih mrmoljaka**

Vrste velikih mrmoljaka hibridizuju u zonama sekundarnog kontakta formirajući hibridne zone koje su uglavnom uske. Hibridi najčešće nisu vijabilni ili su slabo vijabilni (Arntzen i sar. 2014). Kontaktna zona klada TM i TC nalazi se u zapadnoj Evropi (Slike 4 i 5), dok se klade TC i TK susreću na Balkanskom poluostrvu uz donje tokove Dunava i širokoj zoni od Beograda (Srbija) do Soluna (Grčka) (Arntzen 2003; Arntzen i sar. 2014; Arntzen i sar. 2018). S obzirom da nivo srodnosti vrsta utiče na ishod hibridizacije kao i oblik hibridnih zona, bitno je pomenuti da je klada TM filogenetski najudaljenija i odvojena pre oko 27,6 miliona godina od drugih opisanih taksona (npr. Wielstra i Arntzen 2011; Slike 4 i 5). Kod mrmoljaka dolazi do hibridizacije i van prirodnih areala. Zabeleženi su slučajevi hibridizacije između jedinki iz prirodnih populacija i introdukovanih vrsta (Brede

i sar. 2000; Wielstra i sar. 2016). Hibridizacija ima značajan uticaj na interspecijsku morfološku varijabilnost (Crnobrnja-Isailović i sar. 1997; Arntzen i sar. 2009; Slijepčević i sar. 2015; Arntzen i sar. 2018). Hibridizacija utiče i na povišen nivo enzima oksidativnog stresa kod velikih mrmoljaka (Gvoždik 2012; Prokić i sar. 2018).

Izuzetak od ustaljenog obrasca formiranja hibridnih zona velikih mrmoljaka je *T. ivanbureschi* – *T. macedonicus* zona sekundarnog kontakta koja se karakteriše specifičnim scenarijom zamene rasprostranjenja vrsta uključujući formiranje enklave jedne vrste, široku zonu introgresije i vijabilne hibridne populacije. *Triturus ivanbureschi* i *T. macedonicus* su srodne vrste koje pripadaju različitim kladama (TK i TC) razdvojenim tokom kasnog Miocena pre oko 9 do 7 miliona godina (Ivanović i Arntzen 2014; Wielstra i sar. 2019; Slike 4 i 5). Reprodukuj se u sličnim akvatičnim staništima (Džukić i sar. 2016). Zona kontakta prostire se u centralnim (Radošice – Župa) i istočnim (okolina Pirota) delovima Srbije. *Triturus macedonicus* je, šireći areal ka severu, presekao areal *T. ivanbureschi* deleći ga na severnu enklavu i južni, veći deo areala. U zoni kontakta dolazilo je do intezivne hibridizacije, koja je rezultovala širokom zonom introgresije u centralnom delu Srbije (oko 54 000 km<sup>2</sup>). Zbog asimetrične introgresije *T. ivanbureschi* mitohondrijske DNK, jedinke na ovom području imaju *T. macedonicus* jedarnu, a *T. ivanbureschi* mitohondrijsku DNK. Prisustvo *T. ivanbureschi* mitohondrijske DNK smatra se genomskim otiskom prethodnog areala ove vrste (Wielstra i Arntzen 2012; Arntzen i sar. 2014; Wielstra i sar. 2017). Na prostorima u kojima ove dve vrste dolaze u kontakt i danas se javlja hibridizacija, što ukazuje da se aktivna hibridna zona još uvek održava. U istočnoj Srbiji (selo Vlasi, okolina Pirota) potvrđena je unimodalna vijabilna hibridna populacija sastavljena od F<sub>n</sub> hibridnih jedinki nastalih dugogodišnjim, višegeneracijskim međusobnim ukrštanjem i povratnim ukrštanjem sa roditeljskim vrstama (Wielstra i Arntzen 2014; Wielstra i sar. 2014c; Arntzen i sar. 2018). Hibridna populacija je genetički srodnija sa *T. ivanbureschi*, što je u skladu sa prostornim rasporedom populacija po kom su populacije *T. ivanbureschi* geografski bliže. Takođe, sve jedinke u hibridnoj populaciji imaju *T. ivanbureschi* mitohondrijsku DNK. Zbog visoke morfološke varijabilnosti unutar same hibridne populacije nije moguće razlikovati hibridne jedinke od

jedinki iz roditeljskih populacija na osnovu spoljašnje morfologije i obrazaca obojenosti (Arntzen i sar. 2018).

Donekle sličan scenario, po kom dolazi do zamene vrsta na određenom delu areala i hibridizacije, zabeležen je u zapadnoj Francuskoj gde se susreću dve vrste koje pripadaju filogenetski udaljenijim kladama *T. cristatus* i *T. marmoratus* (Slike 4 i 5). Biologija i ekologija ove dve vrste kao i njihovih hibrida predmet je višedecenijskih istraživanja. U regionima gde dolazi do preklapanja areala *T. cristatus* naseljava uglavnom ravničarske predele, dok *T. marmoratus* preferira šumovita i brdovita područja, te je njihovo rasprostranjene mozaično. Hibridna zona je bimodalna sa samo oko 4% hibridnih jedinki u adultnoj populaciji. Recipročna ukrštanja dve vrste ukazala su da postoji izrazita asimetrija u uspešnosti ukrštanja (90% adultnih F<sub>1</sub> hibridnih jedinki poseduje *T. cristatus* mitohondrijsku DNK). Embrioni i larve obe grupe recipročnih hibrida prisutni su u prirodnim populacijama i to u sličnim učestalostima. Dakle, do asimetrije dolazi nakon izvaljivanja larvi dejstvom diferencijalne selekcije. Hibridi dobijeni ukrštanjem *T. cristatus* ženki i *T. marmoratus* mužjaka su uglavnom ženke (72%). Hibridi dobijeni recipročnim ukrštanjem, znatno su manje zastupljeni u populacijama i isključivo su mužjaci (Arntzen i sar. 2009). Smatra se da je *T. cristatus* u poslednjih pola veka u ekspanziji i širi areal zauzimajući regione koje je prvobitno naseljavao samo *T. marmoratus*. Ekspanzija *T. cristatus* omogućena je različitim antropogenim uticajama, pre svega izmenom i fragmentacijom staništa. Broj položenih jaja tokom jedne reproduktivne sezone skoro je duplo veći kod *T. marmoratus* ženki u odnosu na *T. cristatus*. Hibridne ženke polažu više jaja od obe roditeljske vrste u laboratorijskim uslovima, dok je broj hibridnih jaja pronađen u prirodi znatno niži. Dakle, reproduktivni potencijal hibridnih ženki je visok, ali je niska stopa vijabilnosti jaja. Stopa preživljavanja embriona do završetka neurulacije obe vrste je 40 do 50% što je očekivano s obzirom na balansni letalni sindrom roda *Triturus*. Međutim, stopa preživljavanja hibridnih embriona je znatno niža (12%). Stopa izvaljivanja larvi je snižena 70 do 90 % u odnosu na roditeljske vrste (Vallée 1959; Francillon-Viellot i sar. 1990; Arntzen i Hedlund 1990; Arntzen i Wallis 1991).

Ako se setimo pomenute Hjuittove (Hewitt 1988) definicije hibridnih zona, možemo da zaključimo da se na teritoriji Srbije nalazi specifična „prirodna laboratorija“ koja omogućava izučavanje i praćenje različitih evolucionih fenomena. Upravo ta specifičnost je u značajnoj meri komplikovala razrešavanje taksonomije i distribucije velikih mrmoljaka na Balkanskom poluostrvu. Razvitkom novih metoda i jedarnih markera, omogućeno je detaljnije sagledavanje i objašnjavanje međusobnih odnosa vrsta, kao i uvid u mehanizme koji su doprineli formiranju, održavanju i pomeranju hibridne zone kroz prostor i vreme. Međutim, da bi se dati mehanizmi preciznije objasnili, neophodna su istraživanja biologije i ekologije datih vrsta kao i njihovih hibrida.

## 2 Ciljevi rada

---

Osnovni cilj disertacije je utvrđivanje uticaja hibridizacije na vijabilitet, morfološku varijabilnost i stabilnost razvića velikih mrmoljaka (rod *Triturus*) i određivanje parametara koji su doprineli formiranju i održavanju hibridne zone *Triturus ivanbureschi* – *T. macedonicus* uključujući ekspanziju *T. macedonicus* i asimetričnu introgresiju *T. ivanbureschi* mitohondrijske DNK. Rezultati dobijeni ovim istraživanjima omogućavaju sagledavanje procesa i mehanizama koji dovode do introgresivne hibridizacije, pomeranje hibridnih zona i specijacije. Sagledavanje ovih procesa podrazumeva, pre svega, poređenje reproduktivnog potencijala dve vrste, vijabilnosti i stope preživljavanja embriona i larvi obe vrste i njihovih hibrida. Kvantifikacija promena oblika tokom ontogenije kod roditeljskih vrsta i njihovih hibrida omogućava procenu vremena divergencije ontogenetskih putanja i razumevanje mehanizama koji dovode do morfološke divergencije s posebnim osvrtom na uticaj metamorfoze i složenog, bifazičnog životnog ciklusa na kanalisnost, disparitet i razvojne puteve. Poređenje nivoa fluktuirajuće asimetrije kranijalnog skeleta kod četiri vrste velikih mrmoljaka i dve različite grupe hibrida iz prirodnih populacija, omogućava procenu uticaja hibridizacije na stabilnost razvića. S tim u vezi, postavljeni su konkretni ciljevi istraživanja:

- Određivanje eventualnih pre- i postzigotskih reproduktivnih barijera među srodnim vrstama;
- Poređenje parametara životne istorije dve vrste i recipročnih hibrida (reproduktivni potencijal roditeljskih vrsta, vijabilitet jaja i embriona, stopa izvaljivanja larvi, brzina razvića larvi);
- Rekonstrukcija ontogenetskih putanja od tek izvaljenih larvi do metamorfoziranih juvenilnih jedinki uz poseban osvrt na složeni životni ciklus i metamorfozu kao ontogenetsko ograničenje;
- Određivanje uticaja hibridizacije na morfološku varijabilnost (oblik repa i oblik glave kod larvi, kao i oblik glavenog skeleta kod adulta);
- Utvrđivanje uticaja hibridizacije na stabilnost razvića.

### 3 Materijal i metode

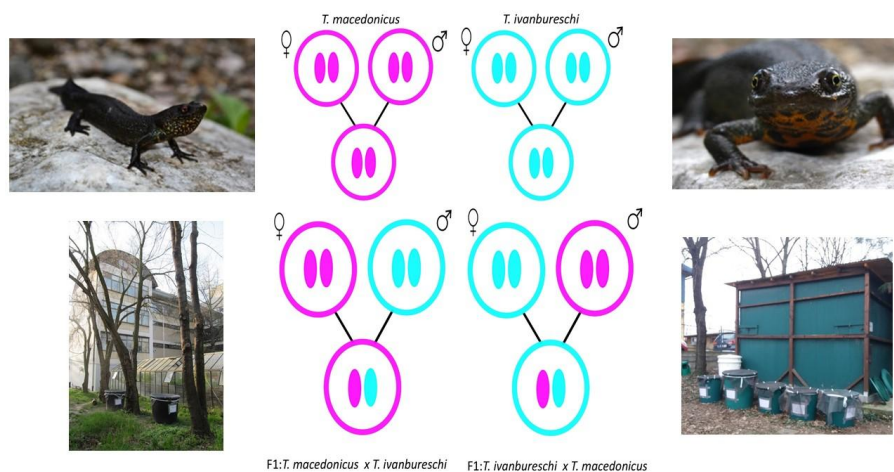
---

Terenska istraživanja obuhvatala su sakupljanje adultnih jedinki iz populacija udaljenih od hibridne zone (Wielstra i sar. 2014b). Jedinke *T. ivanbureschi* prikupljene su na proleće 2014. godine sa lokaliteta Zli Do, Srbija (42°25 N; 22°27 E) uz dozvolu broj 353-01-75/2014-08 Ministarstva energetike, razvoja i zaštite životne sredine (Prilog 3). Jedinke *T. macedonicus* prikupljene su tokom leta 2015. godine sa lokaliteta Ceklin u Crnoj Gori (42°21 N; 18°59 E) uz dozvolu broj UPI-328/4 –agencije za zaštitu životne sredine Vlade Crne Gore (Prilog 4). Jedinke obe vrste prenete su u laboratoriju Odeljenja za evolucionu biologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu, gde je i urađen eksperimentalni deo ove doktorske disertacije uz odluku broj 03-03/16 Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (Prilog 5). Životinje su držane i odgajane u skladu sa Evropskom direktivom (2010/63/EU) o zaštiti životinja korišćenih u eksperimentalne i druge naučne svrhe.

#### 3.1 Eksperimentalni dizajn

Hibridizacioni eksperiment trajao je tri uzastopne godine. Osnovne eksperimentalne postavke i uslovi bili su isti tokom sve tri godine eksperimenta. Nakon hibernacije u hladnoj sobi ili frižideru na konstantnoj temperaturi od 4°C, početkom marta životinje su smeštane u plastične kace (200 do 400 litara) u dvorištu Instituta. U kacama su se nalazila skrovišta za životinje, pesak, suvo lišće, grančice, plastični poklopci kao „plutajuća ostrva“ koji su omogućavali izlazak životinja na površinu vode, kao i plastične tračice za polaganje jaja kao imitacija podvodne vegetacije. Kace su bile prekrivene mrežom za komarce tako da je ispoštovan režim dnevno-noćne dinamike. Na taj način umanjen je stres životinja u zatočeništvu i omogućeno je praćenje dodatnih uticaja na reprodukciju (npr. spoljašne temperature). Životinje su hranjene dva puta nedeljno brašnim crvićima, kišnim glistama i/ili tubifeksom. Kombinacije ukrštanja razlikove su se među godinama, što je omogućilo praćene više različitih parametara. Osnovni dizajn eksperimenta dat je na Slici 6.





Slika 6. Osnovni dizajn eksperimenta. Spoljašnji krug označava mitohondrijsku DNK, a unutrašnje ispunjene elipse jedarnu. Levo je fotografija *T. macedonicus*, desno *T. ivanbureschi* (fotograf: dr Aleksandar Urošević). Donje fotografije su iz dvorišta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“.

Pilot eksperiment izveden je 2016. godine sa dva interspecijska, recipročna ukrštanja:

- 1) ♀ *T. ivanbureschi* × ♂ *T. macedonicus*
- 2) ♀ *T. macedonicus* × ♂ *T. ivanbureschi*

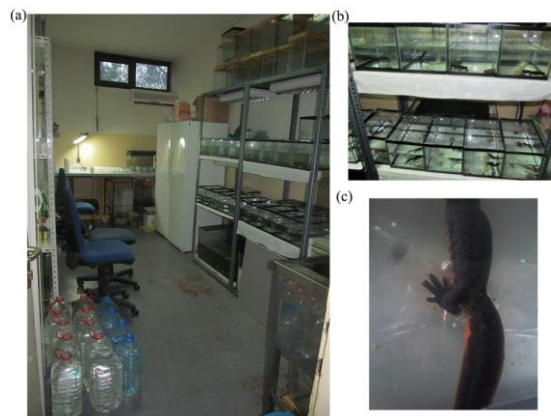
Drugi eksperiment izveden je 2017. godine sa dva intraspecijska i dva interspecijska ukrštanja:

- 1) ♀ *T. ivanbureschi* × ♂ *T. ivanbureschi*
- 2) ♀ *T. macedonicus* × ♂ *T. macedonicus*
- 3) ♀ *T. ivanbureschi* × ♂ *T. macedonicus*
- 4) ♀ *T. macedonicus* × ♂ *T. ivanbureschi*

Treći eksperiment izveden je 2018. godine. Da bi se potvrdili rezultati dobijeni 2017. godine, ponovljena su sva ukrštanja. Hibridne jedinice dobijene ukrštanjem ♀ *T. ivanbureschi* × ♂ *T. macedonicus* 2016. godine (u daljem tekstu: F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki) postale su polno zrele i uključene se u eksperiment u cilju ispitivanja eventualnih pre- i postzigotskih barijera pri međusobnom ukrštanju, kao i povratnom ukrštanju sa roditeljskim vrstama. Ukupno je izvedeno devet ukrštanja:

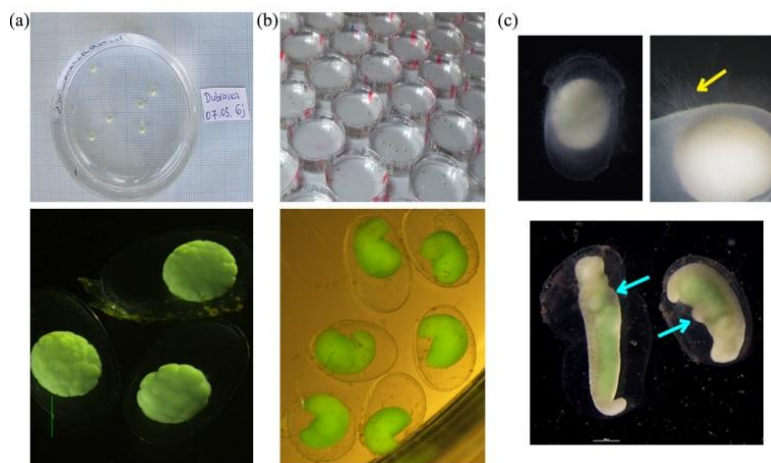
- 1) ♀ *T. ivanbureschi* × ♂ *T. ivanbureschi*
- 2) ♀ *T. macedonicus* × ♂ *T. macedonicus*
- 3) ♀ *T. ivanbureschi* × ♂ *T. macedonicus*
- 4) ♀ *T. macedonicus* × ♂ *T. ivanbureschi*
- 5) ♀ × ♂ F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki
- 6) ♀ F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki × ♂ *T. ivanbureschi*
- 7) ♀ F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki × ♂ *T. macedonicus*
- 8) ♀ *T. ivanbureschi* × ♂ F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki
- 9) ♀ *T. macedonicus* × ♂ F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki

Početak ovipozicije praćen je svakodnevnom proverom svih kombinacija ukrštanja. Po početku polaganja jaja u datom ukrštanju, ženke su pojedinačno smeštane u odvojene akvarijume ili plastične kutije u laboratoriji. Na taj način bilo je moguće proceniti procenat oplodjenih ženki, tj. ženki koje polažu jaja, kao i dalje praćenje materinskog efekta na različite karakteristike životne istorije (Slika 7). Temperatura je održavana konstantnom od polaganja jaja, preko izvaljivanja larvi do završetka metamorfoze (18 do 19°C). Akvarijumi i plastične kutije bili su zapremine 10 litara i do pola napunjeni odstojalom, dehlorisanom vodom. U svaki akvarijum/plastičnu kutiju postavljene su po dve plastične tračice za polaganje jaja.



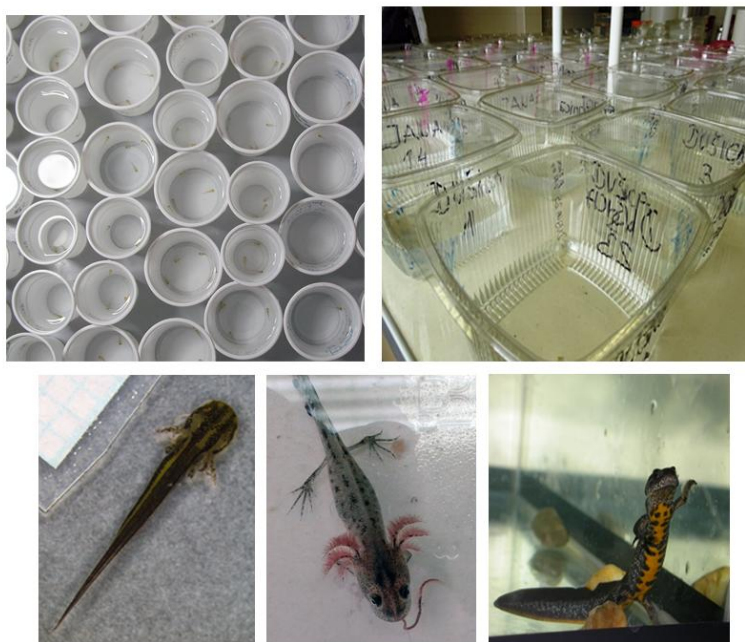
Slika 7. Polaganje jaja: a) izgled laboratorije; b) postavka akvarijuma; c) polaganje jaja na plastičnu tračicu.

Jaja su prikupljena u roku od 24 časa od momenta polaganja i premeštana u plastične Petri šolje (do 10 jaja po Petri šolji) gde su se razvijala do izvaljivanja larvi. Dehlorisana voda u Petri šoljama menjana je svaki drugi dan. Petri šolje su svakodnevno pregledane i uklanjana su jaja i embrioni koji su prestali da se razvijaju kako bi se sprečila infekcija gljivom *Saprolegnia* sp. (Slika 8).



Slika 8. Poređenje zdravih jaja i embriona sa jajima i embrionima koji se ne razvijaju: a) jaja koja se razvijaju fotografisana digitalnom kamerom (gore) i pod binokularom (dole); b) zdravi embrioni fotografisani digitalnom kamerom (gore) i pod binokularom (dole); c) gore – jaja koja se ne razvijaju, žuta strelica ukazuje na hife *Saprolegnia* sp.; dole – embrioni koji su stali sa razvićem na različitim stupnjevima, plava strelica ukazuje na plik karakterističan za balansni letalni sindrom, odnosno embrione koji zaostaju u razviću i uginjavanju.

Larve su po izvaljivanju premeštane u plastične čašice od 100 ml do pola napunjene dehlorisanom vodom. Nakon menjanja vode svaki drugi dan, hranjene su rakovima roda *Artemia*. Posle određenog perioda larve su pojedinačno prebacivane u dvolitarske četvrtaste plastične kutije gde su se razvijale do metamorfoze. Kutije su bile do pola napunjene dehlorisanom vodom koja je menjana dva puta nedeljno uz svakodnevno čišćenje ekskremenata. Starije larve su hranjene tri puta nedeljno crvima *Tubifex* sp. (Slika 9).



Slika 9. Gajenje larvi.

## 3.2 Prikupljanje podataka

### 3.2.1 Procene reproduktivnog potencijala i karakteristika rane životne istorije

Sve jedinice u eksperimentu fotografisane su sa ventralne i dorzalne strane digitalnim fotoaparatom Nikon Coolpix 4500. Obrazac mrlja na abdomenu predstavlja individualnu karakteristiku svake jedinice velikih mrmoljaka (npr. Arntzen 2003), te su fotografije ventralne strane tela sa mrljama kao markerima korišćene za raspoznavanje jedinki. Na taj način omogućeno je ponavljanje istih ukrštanja i poređenje podataka o reproduktivnim karakteristikama svake ženke tokom tri godine eksperimenta. Veličina tela od njuške do posteriorne ivice kloake (engl. *snouth to vent length* – SVL) merena je sa fotografija dorzalne strane ženki.

Tokom svakog reproduktivnog ciklusa praćen je broj ženki koje su polagale jaja u odnosu na ukupan broj ženki. Beleženi su datumi prvog i poslednjeg dana polaganja jaja da bi se procenili periodi ovipozicije. Ukupan period polaganja jaja za vrstu podrazumevao je

broj dana od prvog položenog jajeta u kacama, do poslednjeg položenog jajeta u akvarijumu. Smatrano je da su ženke prestale sa polaganjem kada prođe najmanje nedelju dana od poslednjeg položenog jajeta. Odmah po prikupljanju, jaja su prebrojavana i fotografisana digitalnim fotoaparatom Nikon Coolpix 4500 ili Nikon Digital Sight Fi2 kamerom prikačenom za Nikon SMZ800 stereo zoom mikroskop. Pošto su se brojevi ženki uključenih u eksperiment, kao i procenti ženki koje su polagale jaja, razlikovali tokom tri godine eksperimenta, računat je prosečan broj položenih jaja po ženki za svaku vrstu i svaku godinu. Prosečan broj položenih jaja jedne vrste računat je kao količnik ukupnog broja jaja koje su položile sve ženke i broja ženki koje su polagale jaja. Dimenzije jaja (maksimalna dužina i širina galerte, maksimalna širina vitelusa) merene su sa fotografija. Navedena merenja vršena su u programu ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2018). Zapremina vitelusa računata je pomoću jednačine za zapreminu sfere ( $V = 4/3 \times r^3 \pi$ ;  $r$  predstavlja širinu vitelusa podeljenu sa 2). Zapremina galerte računata je pomoću jednačine za zapreminu elipsoida ( $V = 4/3 \times r_1 r_2^2 \pi$ ;  $r_1$  i  $r_2$  su poluprečnici:  $r_1 =$  dužina galerte/2,  $r_2 =$  širina galerte/2) (prema Furtula i sar. 2008). Razlika u veličini jaja između dve vrste poređena je na podacima prikupljenim u jednoj sezoni (2017). Razlika u veličini jaja između ženki (po 50 nasumično odabranih jaja po ženki za sve tri sezone) poređena je među sezonama za tri ženke vrste *T. macedonicus*. Da bi se opisali periodi polaganja jaja, izračunat je procenat preklapanja perioda ovipozicije dve vrste za tri sezone. Procenat jaja položenih tokom rane (prva trećina ukupnog perioda), središnje (druga trećina) i kasne (treća trećina) faze perioda polaganja izračunat je za obe vrste u svakoj sezoni pojedinačno. Prosečan broj položenih jaja po danu izračunat je kao odnos ukupnog broja jaja položenih tokom celog perioda i broja dana trajanja ovipozicije.

Praćen je broj jaja i embriona koji se ne razvijaju, kao i broj izvaljenih larvi. Na osnovu odnosa ovih brojeva procenjeni su vijabilitet jaja i embriona, i stopa izvaljivanja za obe roditeljske vrste i njihove recipročne hibride tokom jedne reproduktivne sezone (2017. godine). Za svaku grupu izračunat je prosečan broj položenih jaja, jaja i embriona koji se ne razvijaju, u odnosu na broj ženki koje su polagale u datoj sezoni. Udeo jaja koja se ne razvijaju i embriona koji staju sa razvićem računat je kao procenat jaja, odnosno

embriona, koji se ne razvijaju u odnosu na ukupan broj položenih jaja. Stopa izvaljivanja larvi je računata kao procenat izvaljenih larvi u odnosu na ukupan broj položenih jaja. Takođe, izračunat je procenat uginulih embriona i stopa izvaljivanja larvi u odnosu na broj jaja koja su se razvijala. Ovi podaci su korišćeni da bi se procenio uticaj hibridizacije na rane karakteristike životne istorije.

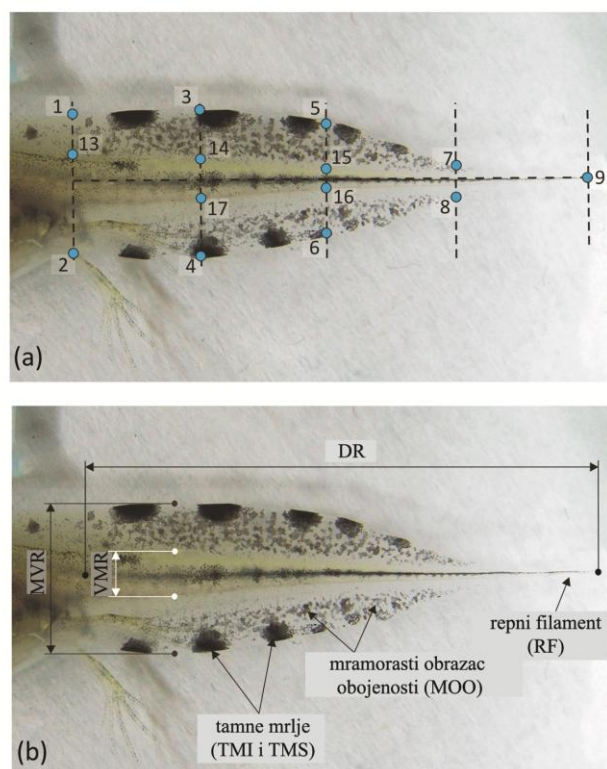
Uticaj hibridizacije na morfološku varijabilnost larvi procenjen je ispitivanjem oblika repa (na odabranom larvenom stupnju) i obrazaca promene oblika glave tokom larvene ontogenije od izvaljivanja do završetka metamorfoze. Na istim stupnjevima jedinke su fotografisane Nikon Digital Sight Fi2 kamerom prikačenom za Nikon SMZ800 stereo zoom mikroskop i digitalnim fotoaparatom Nikon Coolpix 4500. Pored podataka dobijenih u opisanim eksperimentima, korišćene su i fotografije ontogenije larvi *T. ivanbureschi* dobijene u eksperimentu 2014. godine (dozvola broj 01-05/2014 Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“). Postavka tog eksperimenta je bila ista kao i u prethodno opisanim eksperimentima. Srednje vrednosti oblika glave na svakom stupnju korišćene su za rekonstrukcije ontogenetskih trajektorija svake grupe, kao i za procenu stopa rasta i brzine razvića larvi.

### **3.2.2 Analize veličine i oblika, odabir morfoloških struktura, specifičnih tačaka i ontogenetskih stupnjeva**

Pri proceni veličine i oblika datih morfoloških struktura i rekonstrukciji ontogenetskih putanja, kao i za njihovo međusobno poređenje, korišćene su metode geometrijske morfometrije. Morfometrija uopšteno podrazumeva kvantitativan opis, analizu i interpretaciju veličine i oblika organizma ili neke njegove morfološke strukture. Geometrijska morfometrija, koristeći metode multivarijatne statistike, omogućava proučavanje varijabilnosti i kovarijabilnosti oblika i veličine morfoloških struktura, kao i grafički prikaz promena oblika (npr. Klingenberg 2013). Oblik struktura je opisan pomoću konfiguracija specifičnih tačaka (engl. *landmarks*). Varijable oblika (Prokrastove varijable) dobijaju su Prokrastovom analizom (engl. *Generalized Procrustes Analysis* – GPA), odnosno Prokrastovom superimpozicijom. Skaliranjem, translacijom i rotacijom eliminišu

se sve razlike uslovljene veličinom, položajem i orijentacijom, a zadržavaju se samo informacije direktno vezane za oblik. Za procenu veličine neke strukture opisane specifičnim tačkama, koristi se veličina centroida (engl. *centroid size* – CS). Veličina centroida predstavlja meru disperzije specifičnih tačaka od središta (centroida) date konfiguracije i računa se kao kvadratni koren sume kvadrata odstojanja svake specifične tačke od središta za sve tačke (Rohlf i Slice 1990; Bookstein 1997; Dryden i Mardia 1998; Rohlf 2000).

Oblik repa je izabran za poređenje pošto rep predstavlja glavni propulzivni organ, neophodan za lokomociju, ishranu i izbegavanje predatora. Za procenu oblika repa korišćeno je ukupno 150 larvi (*T. ivanbureshi*, N = 32; *T. macedonicus*, N = 36; F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki, N = 35; F1 hibridi *T. macedonicus* majki, N = 47) na početku 62. ontogenetskog stupnja koji se karakteriše potpuno razvijenim ekstremitetima i repom (Glückssohn 1932). Larve su fotografisane na lateralnoj strani. Da bi se opisao oblik repa korišćeno je 17 specifičnih tačaka (Slika 10a) definisanih u programu tpsDig2 (Rohlf 2006). Specifične tačke 1 i 2 pozicionirane su u osnovi repa na nivou distalne ivice kloake i začetka zadnjih ekstremiteta. Specifična tačka 9 postavljena je na vrhu repa. Ostale tačke postavljene su na spoljašnjoj ivici repa sa jednakom međusobnom udaljenošću. Da bi se postigao takav, uniforman raspored tačaka, korišćen je program MakeFan6 iz serije integrisanih programa za morfometriju (engl. *Integrated Morphometrics Program* – IMP) (Sheets 2000). Takođe, zabeležene su i određene linearne mere: maksimalna visina repa (MVP), visina mišića repa (VMR), dužina repa (DR) i dužina tela (DT). Dužina tela je računata od vrha njuške do posteriorne ivice kloake. Sve linearne mere dobijene su merenjem na fotografijama koristeći program TMorphGen6 iz IMP paketa. Veličina centroida merena je u programu CoordGen6 (IMP paket). Koordinate oblika dobijene su Prokrastovom superimpozicijom (GPA) u programu MorphoJ (Klingenberg 2011). Pored oblika repa, ispitivane su i dodatne karakteristike spoljašnje morfologije repa (Slika 10b): mramorasti obrazac obojenosti (MOO), broj tamnih mrlja na ivicama repa (TMI), prisutnost tamnih mrlja na središnjem delu repa (TMS) i prisutnost repnog filament (RF).



Slika 10. Analizirane osobine repa larvi. (a) Pozicija specifičnih tačaka koje opisuju oblik repa, (b) Analizirane osobine spoljašnje morfologije repa i linearne mere: dužina repa (DR), maksimalna visina repa (MVR) i visina mišića repa (VMR) (prilagođeno iz Vučić i sar. 2018).

Za rekonstrukciju ontogenetskih putanja odabran je oblik glave. Oblik i veličina glave imaju uticaja na mnoge, važne biološke funkcije (npr. ishrana, socijalne interakcije, odbrana od predatora). Oblik glave je jedna od osobina koje su izuzetno osetljive na promene tokom procesa razvića tako da čak i najmanje, suptilne promene mogu dovesti do globalnih transformacija u obliku glave (Hallgrimsson i sar. 2014). Za repate vodozemce karakteristično je da je glaveni region dorzo-ventralno spljošten, tako da većina varijabilnosti u celokupnom obliku glave može biti objašnjena analizom dorzalnog oblika (Trueb 1993; Alarcón Ríos i sar. 2017).

Za poređenje oblika glave i rekonstrukciju ontogenetskih putanja, kao i brzine i stope razvića larvi, analizirana je ontogenija 184 jedinke na pet ontogenetskih stupnjeva od



izvaljivanja do završetka metamorfoze. Ukupno je tokom ontogenije prikupljeno 790 individualnih podataka (Tabela 1).

Analizirani su sledeći ontogenetski stupnjevi (Slika 11):

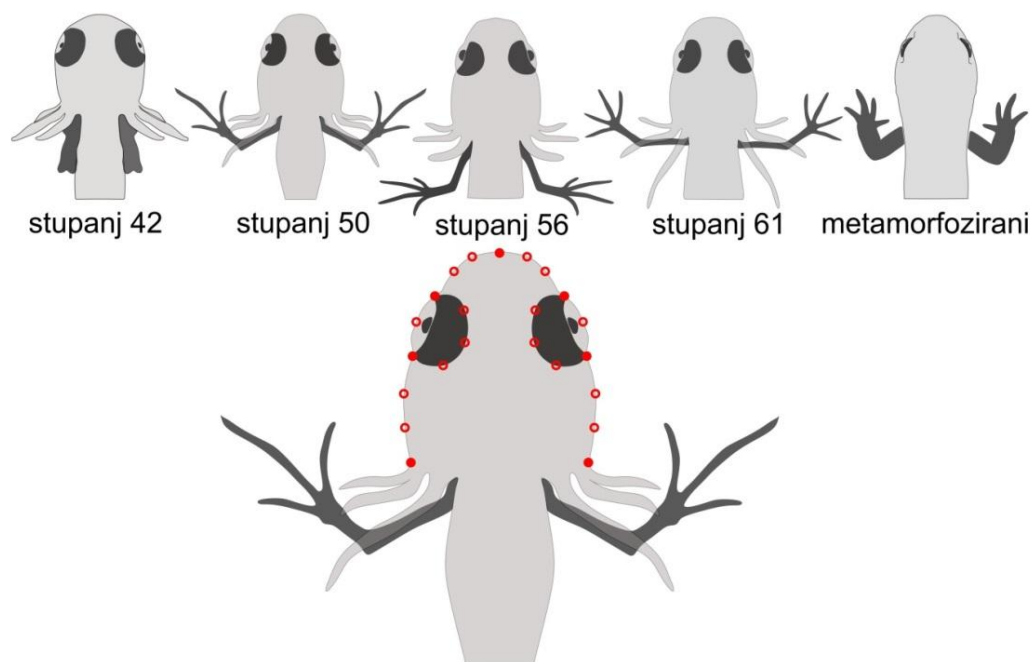
1. Izvaljivanje iz zaštitne opne, početak formiranja prva dva prsta na prednjim ekstremitetima (St. 42-43; Glücksohn 1932);
2. Početak formiranja četvrtog prsta na prednjim ekstremitetima i formiranje pupoljaka zadnjih udova (St. 50; Glücksohn 1932) ;
3. Završetak formiranja četvrtog prsta na prednjim ekstremitetima i početak formiranja trećeg prsta na zadnjim ekstremitetima (St. 56; Glücksohn 1932) ;
4. Početak formiranja petog prsta na zadnjim ekstremitetima (St. 61; Glücksohn 1932) ;
5. Završetak metamorfoze, 7 do 10 dana nakon zatvaranja škržnih otvora metamorforziranih jedinki.

Praćena je hronološka starost na svakom ontogenetskom stupnju i izračunata prosečna vrednost starosti za svaki stupanj (Tabela 1). Hronološka starost je određivana kao broj dana od izvaljivanja larve do dostizanja određenog ontogenetskog stupnja.

Tabela 1. Pregled veličine uzorka, srednja vrednost (SV) sa standardnom devijacijom (SD) hronološke starosti (u danima) i veličine glave (izražena kroz veličinu centroida – CS) larvi na analiziranim ontogenetski stupnjevima. Skraćenice: *T. iva* – *T. ivanbureschi*; *T. mac* – *T. macedonicus*; hib – hibrid; MJ – metamorfozirane juvenilne jedinke.

Stupanj	Grupa	N	Starost (dani) (SV ± SD)	CS (mm) (SV ± SD)
<b>42-43</b>				
	<i>T. ivanbureschi</i>	27	16,48 ± 0,58	4,03 ± 0,21
	<i>T. macedonicus</i>	47	16,89 ± 1,46	4,35 ± 0,25
	F1 hib <i>T. iva</i> majki	49	16,96 ± 1,31	4,19 ± 0,24
	F1 hib <i>T. mac</i> majki	61	16,52 ± 1,44	4,15 ± 0,21
<b>50</b>				
	<i>T. ivanbureschi</i>	29	30,34 ± 1,08	6,20 ± 0,19
	<i>T. macedonicus</i>	43	32,42 ± 2,65	6,67 ± 0,14
	F1 hib <i>T. iva</i> majki	43	33,51 ± 2,97	6,51 ± 0,20
	F1 hib <i>T. mac</i> majki	60	32,60 ± 2,34	6,53 ± 0,16
<b>56</b>				
	<i>T. ivanbureschi</i>	21	46,86 ± 1,88	7,66 ± 0,29
	<i>T. macedonicus</i>	38	61,32 ± 5,59	8,28 ± 0,41
	F1 hib <i>T. iva</i> majki	35	66,94 ± 5,62	8,25 ± 0,51
	F1 hib <i>T. mac</i> majki	49	63,49 ± 5,23	8,07 ± 0,32
<b>61</b>				
	<i>T. ivanbureschi</i>	26	65,42 ± 3,84	9,39 ± 0,47
	<i>T. macedonicus</i>	35	76,71 ± 3,88	9,90 ± 0,57
	F1 hib <i>T. iva</i> majki	36	81,58 ± 3,97	10,42 ± 0,85
	F1 hib <i>T. mac</i> majki	47	79,28 ± 4,74	9,97 ± 0,59
<b>MJ</b>				
	<i>T. ivanbureschi</i>	23	155,56 ± 7,93	21,70 ± 1,18
	<i>T. macedonicus</i>	36	239,94 ± 14,98	23,58 ± 1,21
	F1 hib <i>T. iva</i> majki	37	195,81 ± 17,32	21,67 ± 1,04
	F1 hib <i>T. mac</i> majki	48	189,87 ± 15,90	21,36 ± 1,00

Oblik glave opisan je pomoću 7 specifičnih tačaka i 16 polutačaka (slika 11). Pozicija polutačaka određena je u programu MakeFan6 iz IMP serije (Sheets 2000) da bi se postiglo jednako ugaono rastojanje među polutačkama. Polutačke se koriste za opisivanje oblika površine struktura ili krivih ivica strukture. Za razliku od specifičnih tačaka koje su postavljene na anatomske određene mestima i homologe su među grupama koje se porede, polutačke su raspoređene na površini ili duž krive na jednakim rastojanjima. Ta jednaka rastojanja procenjuju se matematički, podelom krive ili površine na određeni broj delova. Dakle, podatak o obliku strukture sadržan je u zajedničkoj konstalaciji specifičnih tačaka i polutačaka (npr. Zelditch i sar 2012). Specifična tačka 23 postavljena je na sredinu njuške, dok su preostale tačke i polutačke bilateralno simetrične. Veličina centroida (CS, Tabela 1) određena je u programu CordGen6 iz IMP serije (Sheets 2000). Analize oblika glave larvi metodama geometrijske morfometrije vršene su u R paketu *geomorph* 3.0.6 (Adams i sar. 2018), osim ako nije naznačeno drugačije. Prokrastova superimpozicija (GPA) korišćena je za dobijanje koordinata oblika pomoću *gpagen* funkcije. Tokom superimpozicije dodatno je korišćen algoritam za pronalaženje optimalnih pozicija polutačaka na krivoj (Bookstein 1997; Gunz i Mitteroecker 2013). Simetrična komponenta je izračunata kao prosek originalne konfiguracije i iste konfiguracije okrenute „u ogledalu” (Klingenberg i sar. 2002) koristeći funkciju *bilat.symmetry*. U daljim analizama, simetrična komponenta je korišćena kao varijabla oblika.



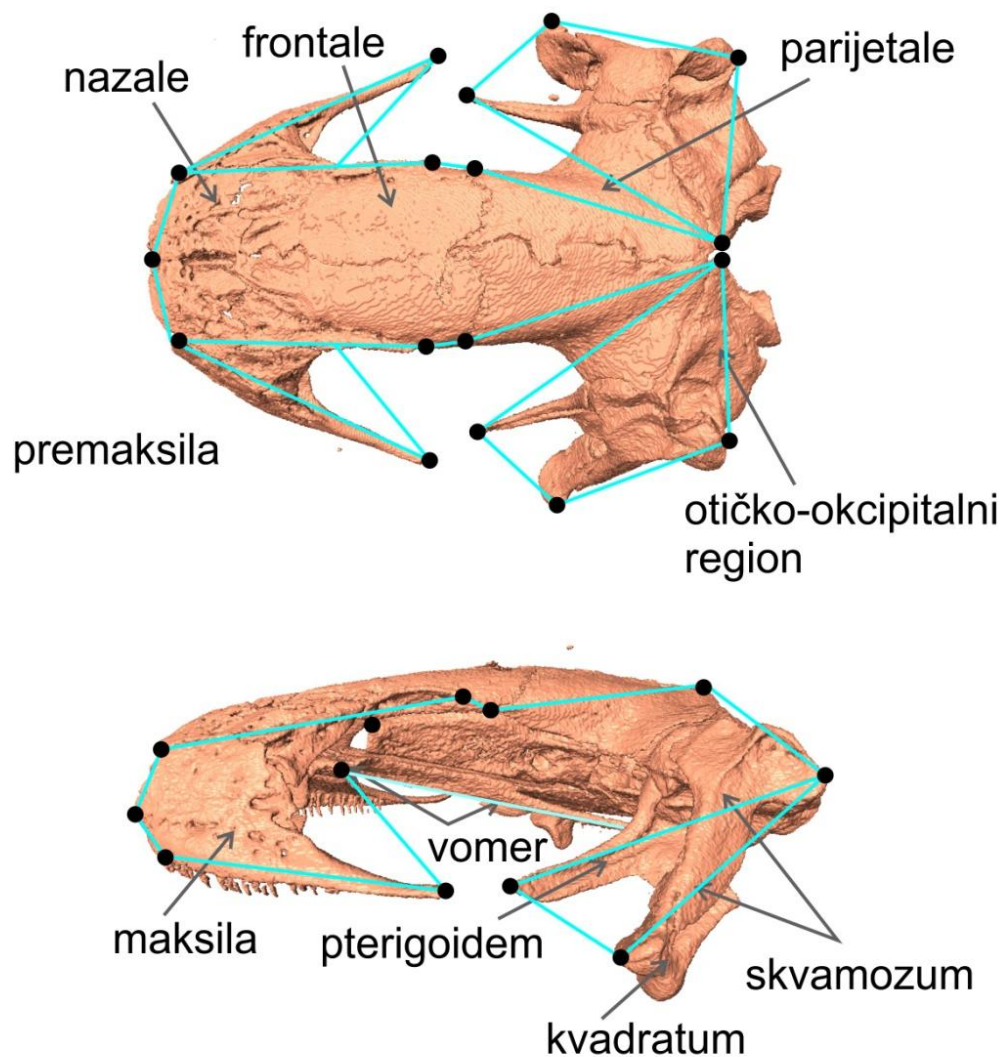
Slika 11. Analizirani ontogenetski stupnjevi i pozicije specifičnih tačaka (pun krug) i polutačaka (prazan krug) koje opisuju oblik glave larvi i metamorfoziranih juvenilnih jedinki velikih mrmoljaka (prilagođeno iz Vučić i sar. 2019).

Za procenu uticaja hibridizacije na morfološku varijabilnost adulata, kao i na stabilnost razvića, korišćeni su trodimenzionalni modeli lobanja velikih mrmoljaka, dobijeni skeniranjem kranijalnog skeleta jedinki prikupljenih iz prirodnih populacija i sačuvanih u batrahološkim zbirkama Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” (Džukić i sar. 2015) i Holandskog nacionalnog centra za biodiverzitet (NATURALIS, Lajden, Holandija). Skeniranje je vršeno metodom kompjuterizovane mikrotomografije (engl. *computed microtomography* –  $\mu$ CT) na aparatu CT Skyscan 1172 u NATURALIS-u. Jedinke su skenirane pod sledećim uslovima (59 kV, stepen rotacije od 0.7, vreme ekspozicije 145 ms i rezolucija od 26.1  $\mu$ m). Na osnovu serije rendgenskih snimaka izvršena je segmentacija u programu NRECON, odnosno generisani su preseki na kojima je odabrano tkivo od interesa. Koristeći rekonstruisane segmentne preseke konstruisani su trodimenzionalni modeli glavenog skeleta u programu Skyscan CT-analyser sa rezolucijom od 26,1  $\mu$ m. Analiziran je ukupno 191 model glavenog skeleta (*T. ivanbureshi*, N = 21;

*T. macedonicus*, N = 19; *T. ivanbureschi* × *T. macedonicus* hibridi, N = 27; *T. cristatus*; N = 37; *T. marmoratus*, N = 42; *T. cristatus* × *T. marmoratus* hibridi, N = 45). Detaljniji pregled uzorka sa podacima o jedinkama i populacijama kojim pripadaju dat je u Prilogu 6. Postavljanje specifičnih tačaka, odnosno prikupljanje x, y, z koordinata, vršeno je u programu Landmark IDAV v 3.0 (<http://www.idav.ucdavis.edu/research/EvoMorph>). Za procenu razlika u obliku lobanje između roditeljskih vrsta i njihovih hibrida postavljeno je 25 specifičnih tačaka (Tabela 2, Slika 12).

Tabela 2. Pozicije specifičnih tačaka određenih anatomskim strukturama i korišćenih pri proceni oblika lobanje vrsta i hibrida velikih mrmoljaka. Prva specifična tačka je neparna, dok su ostale bilateralno simetrične.

Broj	Definicija specifične tačke
1	sredina njuške (medijalna, vršna tačka premaksilarne kosti)
2,3	distalni kraj premaksilarnih kostiju
4,5	vrh maksilarne kosti
6,7	sutura nazalne i maksilarne kosti
8,9	anteriorni deo orbitosfenoideuma ka frontalnoj kosti
10,11	sutura frontalne i parijetalne kosti na spoljašnjoj ivici
12,13	vrh kvadratuma
14,15	posteriorni deo egzookcipitalne kosti ka skvamozumu
15,16	posteriorni spoj parijetalnih kostiju
17,18	proširenje frontalnih kostiju
19,20	vrh pterigoideuma
21,22	posteriorni kraj vomeralnih zuba
23,24	početak vomeralnih zuba
25,26	proširenje vomera u nivou hoana



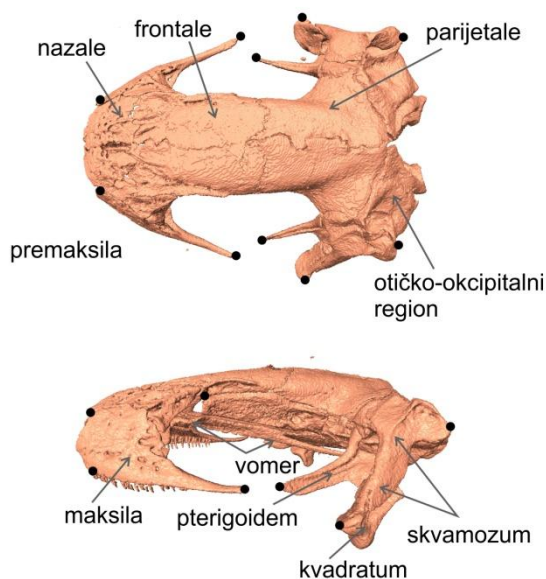
Slika 12. Pozicije specifičnih tačaka koje opisuju oblik kranijalnog skeleta velikih mrmoljaka postavljene na trodimenzionalnim modelima lobanja. Plave linije koje povezuju specifične tačke korišćene su za vizuelizaciju promena oblika.

Pri proceni nivoa fluktuirajuće asimetrije neophodno je da broj specifičnih tačaka koje opisuju oblik morfološke celine bude manji ili jednak najmanjem broju jedinki u uzorku (Zelditch i sar. 2012). Da bi se izbegla eventualna greška uslovljena veličinom uzorka, za procenu uticaja hibridizacije na stabilnost razvića korišćen je redukovani set od

12 tačaka (Tabela 3, Slika 13). Da bi se procenio uticaj greške merenja, odnosno preciznost postavljanja specifičnih tačaka, koordinate specifičnih tačaka su prikupljene dva puta na celokupnom uzorku. Analize metodama geometrijske morfometrije vršene su u programu MorphoJ (Klingenberg 2011).

Tabela 3. Pozicije specifičnih tačaka korišćenih pri proceni stabilnosti razvića odnosno proceni fluktuirajuće asimetrije (FA).

Broj	Definicija specifične tačke
1,2	distalni kraj premaksilarnih kostiju
3,4	vrh maksilarne kosti
5,6	anteriorni deo orbitosfenoideuma ka frontalnoj kosti
7,8	vrh kvadratuma
9,10	posteriorni deo egzookcipitalne kosti ka skvamosumu
11,12	vrh pterigoideuma



Slika 13. Prikaz specifičnih tačaka postavljenih na trodimenzionalnim modelima lobanja i korišćenih za procenu stabilnost razvića velikih mrmoljaka.

### 3.3 Statističke analize

#### 3.3.1 Analize reproduktivnog potencijala i karakteristika rane životne istorije

Veličina tela ženki *T. ivanbureschi* i *T. macedonicus* poređena je pomoću t-testa. Razlika među vrstama u procentu ženki koje su polagale jaje procenjena je testom za razlike između dve proporcije.

Kod obe vrste, broj položenih jaja nije imao normalnu raspodelu te su se u daljim analizama koristile logaritamski transformisane vrednosti. Za svaku sezonu zasebno, poređene su razlike između vrsta u prosečnom broju jaja i statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima testirana je pomoću t-testa. Razlike prosečnog broja položenih jaja među sezonama za obe vrste zasebno i njihova statistička značajnost utvrđene su pomoću jednofaktorske analize varijanse (ANOVA). Da bi se utvrdilo koja sezona najviše doprinosi razlici korišćena je višestruka komparacija *P* vrednosti kao *post-hoc* test. Da bi se procenio ukupan uticaj i udeo svih faktora korišćena je multifaktorska ANOVA sa vrstom, sezonom i njihovom interakcijom kao faktorima. Prosečne vrednosti dimenzija jaja (zapremine vitelusa i galerte) poređene su zasebnim jednofaktorskim ANOVA testovima. Jednofaktorska ANOVA korišćena je i za poređene veličine jaja među sezonama za jednu vrstu. ANOVA za ponovljena merenja korišćena je pri proceni intraspecijske razlike u veličini jaja tokom tri sezone.

Međusobno poređenje procenata jaja i embriona koji nemaju normalno razviće, kao i izvaljenih larvi, između obe vrste i F1 recipročnih hibrida u sezoni 2017. godine, vršeno je pomoću testa za razlike između dve proporcije. Sve prethodno navedene statističke analize rađene su u programu Statistica 10 (StatSoft Inc. 2011).

#### 3.3.2 Analize divergencije u veličini i obliku repa larvi

Pošto je utvrđena razlika u veličini larvi sve dalje analize linearnih mera repa (dužina repa – DR, maksimalna visina repa – MVR i visina mišića repa –VMR) rađene



su na korigovanim vrednostima – rezidualima nakon regresije linearnih mera na dužinu tela. Razlike u lineranim merama među grupama analizirane su analizom kovarijance (ANCOVA) sa dužinom tela kao nezavisnom varijablom i rezidualima DR, MVR i VMR kao zavisnim varijablama. Da bi se odredila značajnost međugrupnih razlika korišćen je Tukijev test (engl. *The Tukey HSD post-hoc test*). Navedene statističke analize urađene su u programu Statistica 10 (StatSoft Inc. 2011). Pošto promena oblika uslovljena promenom veličine (alometrija) može da objašnjava značajan deo ukupne varijacije oblika, uticaj alometrije ispitan je multivarijatnom regresijom varijabli oblika na logaritamski transformisanu veličinu repa (CS) (Monteiro 1999). Statistička značajnost alometrije ispitan je permutacionim testom sa 1000 ponavljanja. Multivarijatna regresija pokazala je da je 8,91% varijabilnosti uslovljeno veličinom i utvrđena je statistička značajnost alometrije. U daljim analizama oblika, kao varijable oblika korišćene su vrednosti korigovane za veličinu, odnosno reziduali dobijeni iz multivarijatne regresije varijabli oblika na CS. Analizom glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis – PCA*) ispitan je opšti obrazac unutargrupne i međugrupne varijabilnosti (dve vrste i recipročni hibridi). Prokrastove distance izračunate su kao mera razlika u srednjim oblicima repa svih grupa unakrsno. Statistička značajnost razlike u obliku repa procenjena je permutacionim testom sa 1000 ponavljanja. Dobijene *P* vrednosti su korigovane Bonferonijevom korekcijom za višestruka poređenja. Analize oblika repa vršene su u programu MorphoJ (Klingenberg 2011). Razlike u obrascima obojenosti i prisutnosti repnog filamenta utvrđene su korespondentnom analizom u programu Statistica 10 (StatSoft Inc. 2011) i G testom u Microsoft Excel 2010 programu.

### **3.3.3 Analize ontogenetskih putanja larvi i promene oblika glave**

Da bi se testirale međugrupne razlike u starosti larvi tokom ontogenije urađene su zasebne analize varijanse (ANOVA) na svakom ontogenetskom stupnju. Statistička značajnost međugrupnih razlika procenjena je Tukijevim testom (engl. *The Tukey HSD post-hoc test*). Isti testovi su izvedeni za testiranje značajnosti razlika u veličini glave

među analiziranim grupama na svim ontogenetskim stupnjevima. Navedene analize rađene su analizom u programu Statistica 10 (StatSoft Inc. 2011). Za procenu razlika u brzini razvića korišćene su dve odvojene multivarijantne regresije varijabli oblika glave (simetrična komponenta) na hronološku starost larvi i ontogenetski stupanj. Korelacija oblika i veličine glave testirana je multivarijantnom regresijom simetrične komponente na veličinu glave. Statistička značajnost regresija testirana je permutacionim testovima sa 1000 ponavljanja. U analiziranom uzorku jedinke su varirale u veličini na svim stupnjevima zbog čega su za komparativne analize kao varijable oblika korišćeni reziduali dobijeni multivarijantnom regresijom varijabli oblika na veličinu glave (Monteiro 1999). Obrasci varijabilnosti oblika glave na svakom ontogenetskom stupnju zasebno su ispitani PCA analizom varijabli oblika koristeći *plotTangentSpace* funkciju u R *geomorph* paketu (Adams i sar. 2018). Međugrupne razlike u obliku glave specifične za svaki ontogenetski stupanj izračunate su kao Prokrastove distance. Statistička značajnost dobijenih razlika testirana je permutacionom testom sa 1000 ponavljanja. Dobijene vrednosti usklađene su Bonferonijevom korekcijom za višestruka poređenja. Računanje Prokrastovih distanci i poređenje njihovih razlika vršeno je u R *Morpho* paketu (Schlager 2017) pomoću *permdist* funkcije.

Da bi se dodatno ispitale komponente statičke varijabilnosti, unutar- i međugrupna varijabilnost oblika glave, kao i utvrdio stepen kanalisnosti razvića, izračunati su varijansa i morfološki disparitet na svakom stupnju zasebno. Unutargrupna varijabilnost (varijansa) je izračunata na setovima podataka sastavljenih od svih jedinki jedne grupe na svim stupnjevima. Varijansa je dobijena kao suma dijagonala elemenata kovariacione matrice podeljena sa brojem opservacija u grupi (Zelditch i sar. 2012; Adams i sar. 2018). Permutacioni test sa 1000 ponavljanja korišćen je za proveru razlika u varijansi među stupnjevima jedne grupe. Međugrupna varijabilnost (morfološki disparitet) računat je kao sveukupna Prokastova varijansa za svaki ontogenetski stupanj. Varijansa i disparitet računati su pomoću *morphol.disparity* funkcije u R *geomorph* paketu (Adams i sar. 2018).

Za ispitivanje dinamičke komponente varijabilnosti, rekonstrukciju i poređenje ontogenetskih trajektorija oblika glave korišćena je analiza fenotipskih trajektorija

(engl. *Phenotypic Trajectory Analysis* – PTA; Adams i Collyer 2009; Collyer i Adams 2013). Glavna prednost PTA analize je ujednačen opis i kvantifikacija trajektorija kroz njihove geometrijske attribute (poziciju, veličinu, pravac i oblik) što omogućava međusobna statistička poređenja trajektorija specifičnih za određene taksone i utvrđivanje obrazaca i procesa koji su doveli do fenotipske divergencije. Za rekonstrukciju ontogenetskih trajektorija, vrste i njihovi hibridi su korišćeni kao grupe, dok je pet ontogenetskih stupnjeva predstavljalo tačke koje trajektorija povezuje. Pozicija trajektorije predstavlja lokaciju trajektorije svake grupe u multivarijantnom prostoru opisanom sa prve dve glavne komponente. Za međugrupno poređene pozicija trajektorije korišćena je faktorijska MANOVA sa grupom, stupnjem i njihovom interakcijom kao faktorima. Veličina trajektorije predstavlja količinu promene oblika kroz koju svaka grupa prolazi tokom ontogenije. Veličina je zapravo dužina putanje izračunata kao suma dužina vektora među sukcesivnim ontogenetskim stupnjevima i izražena kao Euklidova distanca. Pravac trajektorije opisuje opštu orijentaciju fenotipskih promena u multivarijantnom prostoru odnosno opštu kovarijaciju varijabli oblika povezanu sa promenom ontogenetskog stupnja. Pravac se izračunava kao ugao između dve trajektorije i izražava se u stepenima. Oblik trajektorije predstavlja promene trajektorije kroz vreme i izračunava se kao Prokrastove distance među parovima ontogenetskih trajektorija (Adams i Collyer 2007, 2009; Collyer i Adams 2007, 2013). Značajnost razlika među atributima ontogenetskih trajektorija karakterističnih za analizirane grupe procenjena je permutacionim testom sa 10 000 ponavljanja. Atributi ontogenetskih trajektorija izračunati su i upoređeni koristeći *trajectory.analysis* funkciju u R *geomorph* paketu (Adams i sar. 2018).

### **3.3.4 Analize varijabilnosti adultnog glavenog skeleta**

Poređenje oblika glavenog skeleta adultnih jedinki velikih mrmolja i njihovih hibrida vršeno je u programu MorphoJ (Klingenberg 2011).

PCA analizom ispitana je ukupna varijabilnost glavenog skeleta u okviru celog uzorka (četiri vrste i dva hibrida). Da bi se utvrdile razlike u obliku među grupama

izračunate su Mahalanobisove i Prokrastove distance koje su poređene permutacionim testovima sa 1000 ponavljanja. Dobijene vrednosti su prilagođene Bonferoni korekcijom za višestruka poređenja. Kanonijskom diskriminantnom analizom (engl. *Canonical Variate Analysis – CVA*) analizirane su razlike u srednjem obliku glavenog skeleta, pri čemu su vrste i hibridi korišćeni kao varijabla za grupisanje. PCA i CVA analize rađene su na koordinatama dobijenim iz prosečne vrednosti dva merenja.

Da bi se procenio nivo unutargrupne varijabilnosti izračunata je ukupna varijansa za svaku grupu pojedinačno pomoću kovariacionih matrica pri čijem izračunavanju je uklonjen efekat populacije i pola na varijabilnost korišćenjem opcije *pool-within factor* u programu MorphoJ (Klingenberg 2011).

### 3.3.5 Procena stabilnosti razvića

Prokrustova ANOVA je analiza varijanse posebno prilagođena za kvantifikaciju asimetrije i greške merenja (Klingenberg i McIntyre 1998; Klingenberg i sar. 2002; Klingenberg 2015). Ova metoda omogućava utvrđivanje uticaja greške merenja i dodatnih faktora na ukupno variranje oblika: efekta jedinke (međuinidividualnog variranja), efekta strane (prisustvo direkcione asimetrije) i efekta interakcije između jedinke i strane (prisustvo fluktuirajuće asimetrije). Efekat jedinke je slučajni faktor koji objašnjava individualnu varijabilnost u obliku. Efekat strane je fiksirani faktor i ukazuje na prisustvo ili odsustvo direkcione simetrije, dok interakcije jedinka × strana ukazuje na prisustvo ili odsustvo fluktuirajuće asimetrije. Ostatak varijabilnosti (reziduali) predstavlja grešku merenja (Klingeneberg i McIntyre 1998; Klingenberg i sar. 2002). Vrednosti dobijene pomoću Prokrastove analize varijanse (suma kvadrata odstupanja za fluktuirajuću asimetriju i grešku merenja) dalje su korišćene za izračunavanje indeksa fluktuirajuće asimetrije (FA10 indeks) (Palmer i Strobeck 1986). Indeks fluktuirajuće asimetrije je računat prema formuli:

$$FA10 = (MS_{jedinka \times strana} - MS_{greška\ merenja}) / M$$

$MS_{jedinka \times strana}$  predstavlja sumu kvadrata odstupanja za fluktuirajuću asimetriju, a  $MS_{greška\ merenja}$  sumu kvadrata odstupanja greške merenja procenjenih Prokrastovom analizom varijanse za dati uzorak.  $M$  predstavlja broj ponovljenih merenja.

Statistička značajnost razlika u nivou FA vrsta i hibrida procenjena je primenom dva pristupa: Lavenovog testa i  $F$  testa. Lavenov test je rađen na FA skorovima dobijenim iz asimetrične komponente varijabilnosti oblika i izraženim u Prokrastovim distancama.  $F$  testom (Palmer i Strobeck 1986) poređene su vrednosti FA10 indeksa.

Obrasci varijabilnosti asimetrične komponente roditeljskih vrsta i njihovih hibrida dobijeni su PCA analizom asimetričnih koordinata dobijenih iz prosečne vrednosti dva merenja.

## 4 Rezultati

---

### 4.1 Odlike rane životne istorije

#### 4.1.1 Reproduktivne karakteristike

Poređenjem standardne dužine tela (SVL) nije pronađena statistički značajna razlika u veličini tela *T. ivanbureschi* i *T. macedonicus* ženki (t-test:  $P = 0,114$ ; Tabela 4).

Tabela 4. Prosečna veličina tela ženki *T. ivanbureschi* i *T. macedonicus*. Dimenzije su date u milimetrima. Skraćenice: N – broj ženki; SVL – dužina tela od njuške do posteriornog dela kloake; SV – srednja vrednost; min – minimalna izmerena veličina; max – maksimalna izmerena veličina.

	<i>T. ivanbureschi</i>	<i>T. macedonicus</i>
	(N = 15)	(N = 9)
SVL (SV $\pm$ SD)	83,3 $\pm$ 0,6	87,0 $\pm$ 0,4
Opseg (min–max)	69,6–9,1	78,0–90,7

Pregled osnovnih reproduktivnih karakteristika dat je u Tabeli 5. Vrste se međusobno ne razlikuju u proporciji ženki koje polažu jaja ( $P > 0,5$  za sve tri sezone). Ženke *T. macedonicus* imale su značajno veći prosečan broj jaja položen po ženki od *T. ivanbureschi* u 2017. godini ( $P > 0,0214$ ), dok razlike nisu pronađene za 2016. i 2018. godinu ( $P > 0,05$  u oba poređenja). Prosečan broj položenih jaja nije se razlikovao među sezonama za *T. ivanbureschi* ( $P = 0,6752$ ), dok su razlike pronađene među *T. macedonicus* ženkama ( $P = 0,0256$ ). Tukijevim testom utvrđeno je da se razlikuju samo 2016. i 2017. godina ( $P = 0,0210$ ), dok nije pronađena razlika u ostalim međusobnim poređenjima ( $P > 0,05$ ). Kad se sagleda ukupan prosečan broj jaja položen tokom svih sezona, postoji razlika kojoj doprinosi efekat vrste ( $P = 0,039$ ), ali ne i sezone, niti interakcije vrste i sezone ( $P > 0,05$  u oba slučaja).

Tabela 5. Osnovne reproduktivne karakteristike vrsta *T. ivanbureschi* (*T. iva*) i *T. macedonicus* (*T. mac*) tokom tri uzastopne godine.

Godina	Vrsta	Broj ženki	% ženki koje	Ukupno	Opseg broja položenih jaja		Prosečan broj
			su polagale jaja	položenih jaja	kod svih ženki		položenih jaja po ženki
					min	max	
2016	<i>T. iva</i>	7	100,00	727	6	208	103,86
	<i>T. mac</i>	9	88,89	1381	6	371	172,63
2017	<i>T. iva</i>	16	75,00	2500	6	663	208,33
	<i>T. mac</i>	9	100,00	4631	73	759	514,56
2018	<i>T. iva</i>	12	58,33	1364	1	383	194,86
	<i>T. mac</i>	9	66,67	1967	47	619	327,83

U odnosu na veličinu jaja (zapremina vitelusa i galerte) koja su položena tokom iste sezone postoje statistički značajne razlike između vrsta ( $P < 0,0001$  za obe dimenzije), pri čemu su jaja, vitelus i galerta, veća kod *T. macedonicus* (Tabela 6).

Tabela 6. Prosečne vrednosti zapremine vitelusa i galerte (u mm<sup>3</sup>) u istoj reproduktivnoj sezoni (2017. godina).

Vrsta	N	Zapremina vitelusa SV ± SD	Zapremina galerte SV ± SD
<i>T. ivanbureschi</i>	300	5,09 ± 0,96	14,87 ± 1,53
<i>T. macedonicus</i>	350	5,48 ± 0,89	21,18 ± 2,26

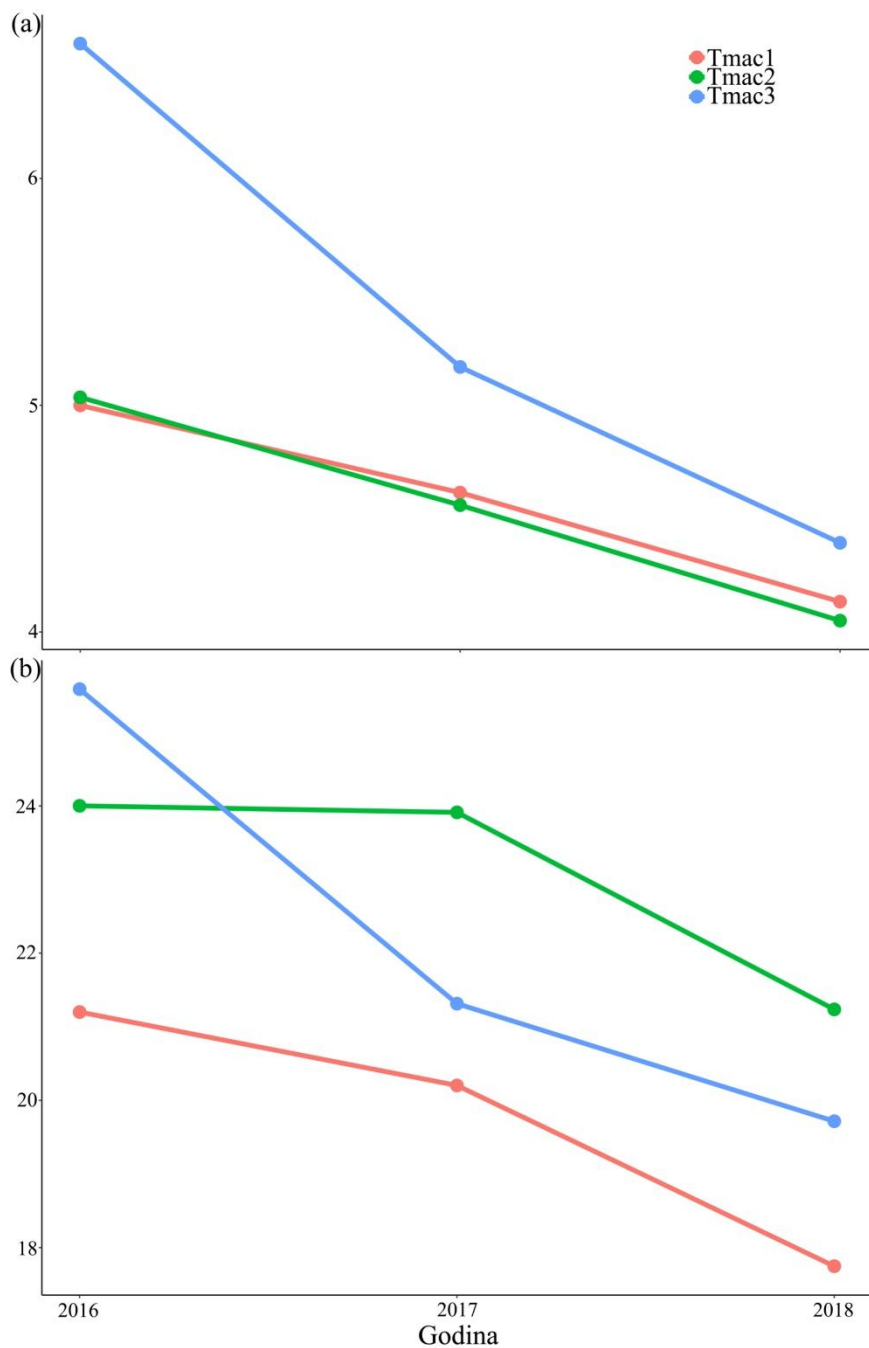
Nije utvrđena statistički značajna razlika u dimenzijama jaja između ženki *T. ivanbureschi* ( $P = 0,07$ ), ali jeste među *T. macedonicus* ženkama ( $P < 0,001$ ). Ukoliko se u obzir uzme variranje u veličini jaja između sezona i ženki, na razlike u veličini jaja utiču oba faktora (ženke,  $P < 0,001$  za obe dimenzije; sezona,  $P < 0,001$  za obe dimenzije) i njihova interakcija ( $P < 0,001$  za obe dimenzije) (Slika 14).

U 2016. godini, ženke *T. macedonicus* počele su da polažu jaja skoro mesec dana kasnije u odnosu na *T. ivanbureschi* ženke, tako da su im se periodi preklapali manje od 10% od celokupnog perioda ovipozicije. U 2017. godini, obe vrste su započele polaganje jaja u slično vreme i celokupan period polaganja jaja se preklapao 56%. Razlika u dužini perioda polaganja nije bila izražena, mada je kod *T. macedonicus* trajala 12 dana duže. U 2018, *T. ivanbureschi* ženke su počele da polažu jaja 10 dana pre *T. macedonicus* i periodi su se preklapali 59% uz skoro istovetno ukupno trajanje (Slika 15).

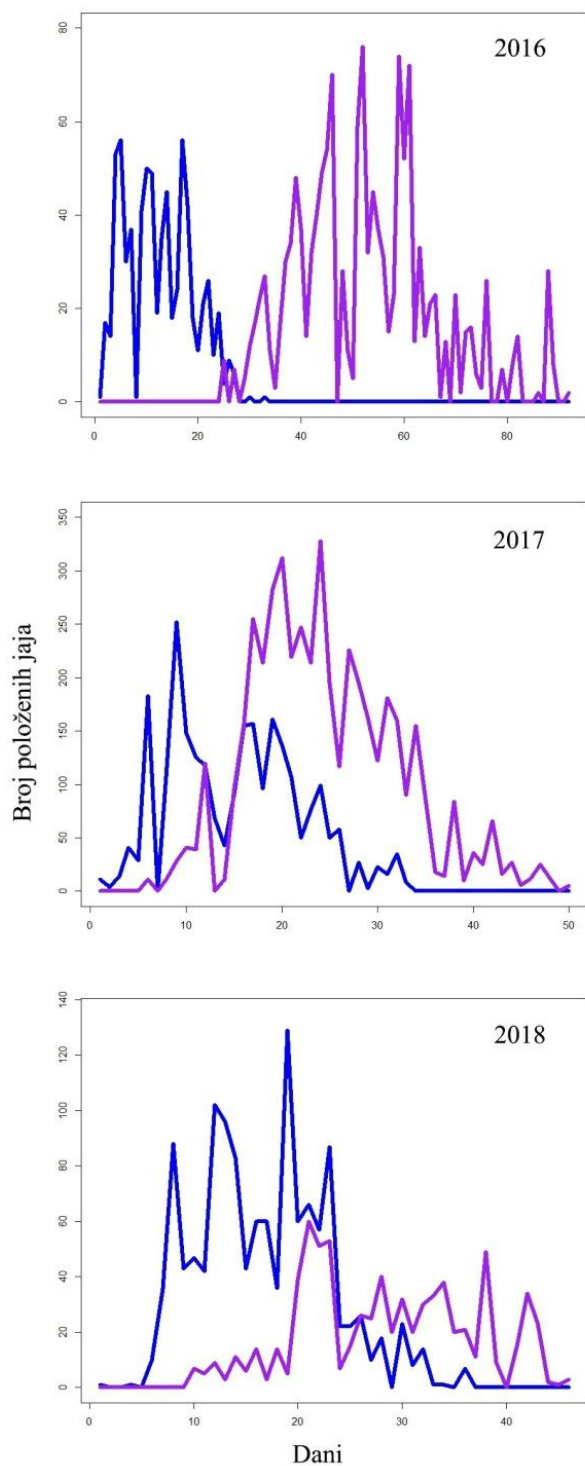
Tokom 2016. godine, sedam *T. ivanbureschi* ženki položilo je najviše jaja tokom rane faze ovipozicije (48,88%). U istoj sezoni imale su dva dana sa istim, maksimalnim brojem položenih jaja (56 jaja – 5. i 17. dana od početka polaganja; rana i središnja faza). U 2017. (16 ženki) i 2018. (12 ženki) godini najviše jaja je položeno tokom središnje faze (47,28% i 61,05%, respektivno), dok je dan sa maksimalnim brojem jaja u obe sezone bio tokom rane faze (2017: 9. dan sa 252 jaja i 2018: 19. dan sa 129 jaja) (Slika 15). Isti obrazac za sve tri sezone utvrđen je za devet ženki *T. macedonicus*, sa najvećim brojem položenih jaja (2016: 50,94%; 2017: 58,24%; 2018: 47,61%) i danom sa maksimalnim



brojem položenih jaja (2016: 28. dan – 76; 2017: 19. dan – 328; 2018: 12. dan – 60 jaja)  
tokom središnje faze perioda polaganja (Slika 15).



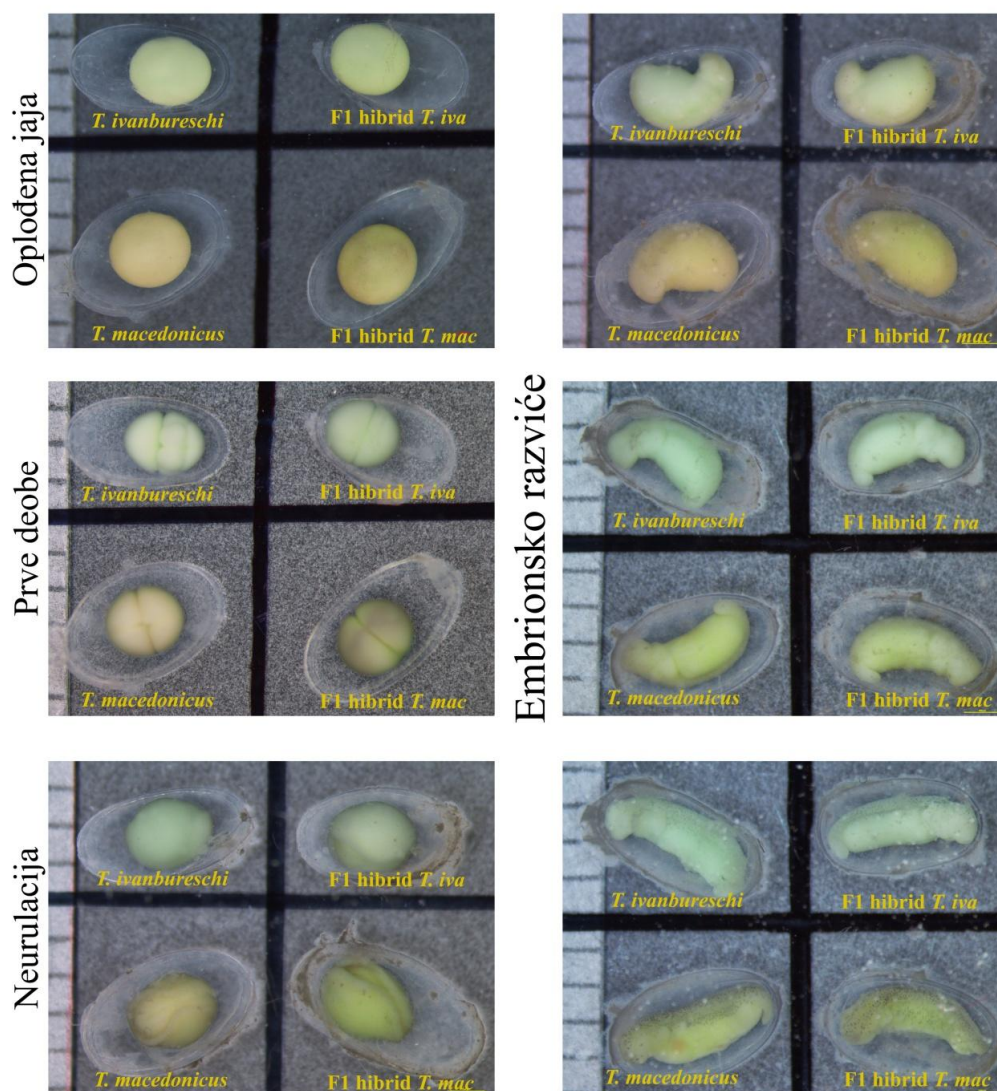
Slika 14. Zapremina vitelusa (a) i galerte (b) jaja tri *T. macedonicus* ženke tokom tri uzastopne reproduktivne sezone (2016, 2017 i 2018).



Slika 15. Razlike u dinamici polaganja jaja (prosečnom broju položenih jaja po danu) između *T. ivanbureschi* i *T. macedonicus* tokom tri uzastopne sezone (2016, 2017 i 2018).

#### 4.1.2 Vijabilnost jaja i embriona, stopa izvaljivanja larvi

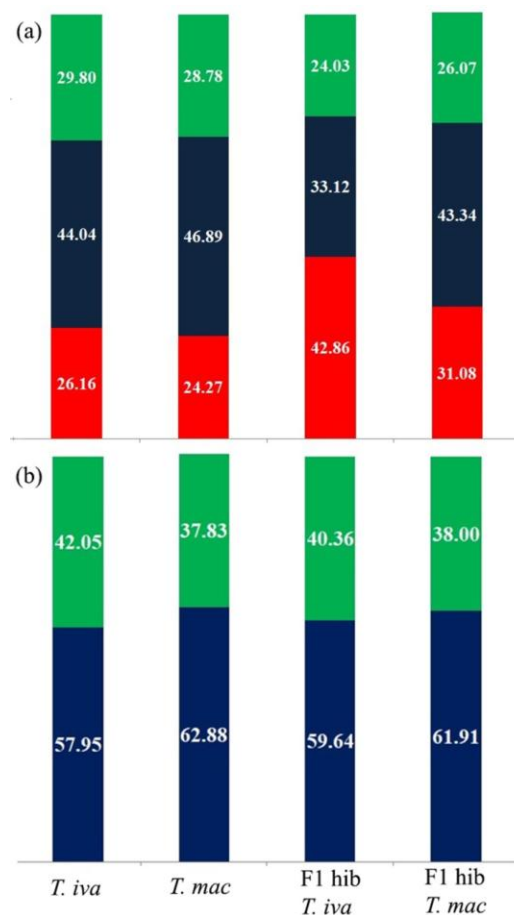
Jaja i embrioni roditeljskih vrsta i hibrida razvijali su se sličnom brzinom (Slika 16).



Slika 16. Ilustrativni pregled serije ranih ontogenetskih stupnjeva *T. ivanbureschi*, *T. macedonicus* i njihovih recipročnih hibrida. Praćena su četiri jajeta položena istog dana.

Dve vrste ne razlikuju se međusobno u udelu jaja i embriona koji se ne razvijaju, kao ni stopi izvaljivanja larvi ( $P > 0,05$  za sva poređenja). Procenat jaja koja se ne razvijaju značajno je veći za oba recipročna hibrida u odnosu na roditeljske vrste ( $P < 0,01$  u svim

poređenjima). Među recipročnim hibridima takođe postoji značajna razlika ( $P < 0,01$ ). Relativni udeo jaja koja se ne razvijaju najveći je kod F<sub>1</sub> hibrida *T. ivanbureschi* majki (slika 17a). Obe roditeljske vrste imaju sličan relativni udeo embriona koji su stali sa razvićem kao i F<sub>1</sub> hibridi *T. macedonicus* majki ( $P > 0,05$  u svim poređenjima), koji je veći nego kod F<sub>1</sub> hibrida *T. ivanbureschi* majki ( $P < 0,01$  u svim poređenjima). Zanimljivo je da se stopa izvaljivanja larvi, iako niska, nije razlikovala ni u jednom poređenju ( $P > 0,05$  u svim poređenjima) (Slika 17a). Kada je računat udeo embriona koji su stali sa razvićem i stopa izvaljivanja larvi u odnosu na broj jaja koja se razvijaju, nisu pronađene razlike ni u jednom poređenju ( $P > 0,05$  u svim poređenjima; Slika 17b).



Slika 17. (a) Relativni udeo jaja (crveno) i embriona koji su stali sa razvićem (teget), kao i izvaljenih larvi (zeleno) u odnosu na broj položenih jaja za sve analizirane grupe. (b) Relativni udeo stalih embriona (teget) i izvaljenih larvi (zeleno) u odnosu na broj jaja koja su se razvijala.

### 4.1.3 Brzina razvića larvi

Statistički značajne razlike u hronološkoj starosti larvi, odnosno broju dana potrebnom da bi se dostigao određeni stupanj, postoje na svim analiziranim stupnjevima (Tabela 1,  $P < 0,0001$ ), osim na prvom (St. 42-43,  $P = 0,2055$ ). Međusobnim poređenjem grupa (Tukijev test, Tabela 7) pokazano je da od drugog analiziranog stupnja (St. 50) pa sve do završetka metamorfoze *T. ivanbureschi* dostiže svaki sukcesivni stupanj ranije u odnosu na *T. macedonicus* i hibride. Razlike su izraženije na kasnijim stupnjevima (Tabela 1). Larve *T. macedonicus* završavaju sa metamorfozom znatno kasnije od svih ostalih analiziranih grupa. Hibridne grupe se ne razlikuju međusobno osim na trećem analiziranom stupnju (St. 56) koji hibridi *T. macedonicus* majki dostižu najkasnije od svih (Tabela 1).

Tabela 7. Međugrupna poređenja (Tukijev test) hronološke starosti larvi na svakom analiziranom ontogenetskom stupnju. Analizirane grupe: *T. ivanbureschi* (*T. iva*), *T. macedonicus* (*T. mac*), F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki (F1 hib *T. iva*), F1 hibridi *T. macedonicus* majki (F1 hib *T. mac*). Skraćenice: MJ – metamorfozirane juvenilne jedinke.

Poređene grupe	Ontogenetski stupanj				
	42-43	50	56	61	MJ
<i>T. iva</i> - <i>T. mac</i>	0,568	0,002	< 0,001	< 0,001	< 0,001
F1 hib <i>T. iva</i> - <i>T. iva</i>	0,432	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
F1 hib <i>T. iva</i> - <i>T. mac</i>	0,999	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
F1 hib <i>T. mac</i> - <i>T. mac</i>	0,475	0,982	0,199	0,032	< 0,001
F1 hib <i>T. mac</i> - <i>T. iva</i>	0,995	0,161	< 0,001	< 0,001	< 0,001
F1 hib <i>T. iva</i> - F1 hib <i>T. mac</i>	0,316	0,242	0,012	0,063	0,290

## 4.2 Morfološka varijabilnost larvi

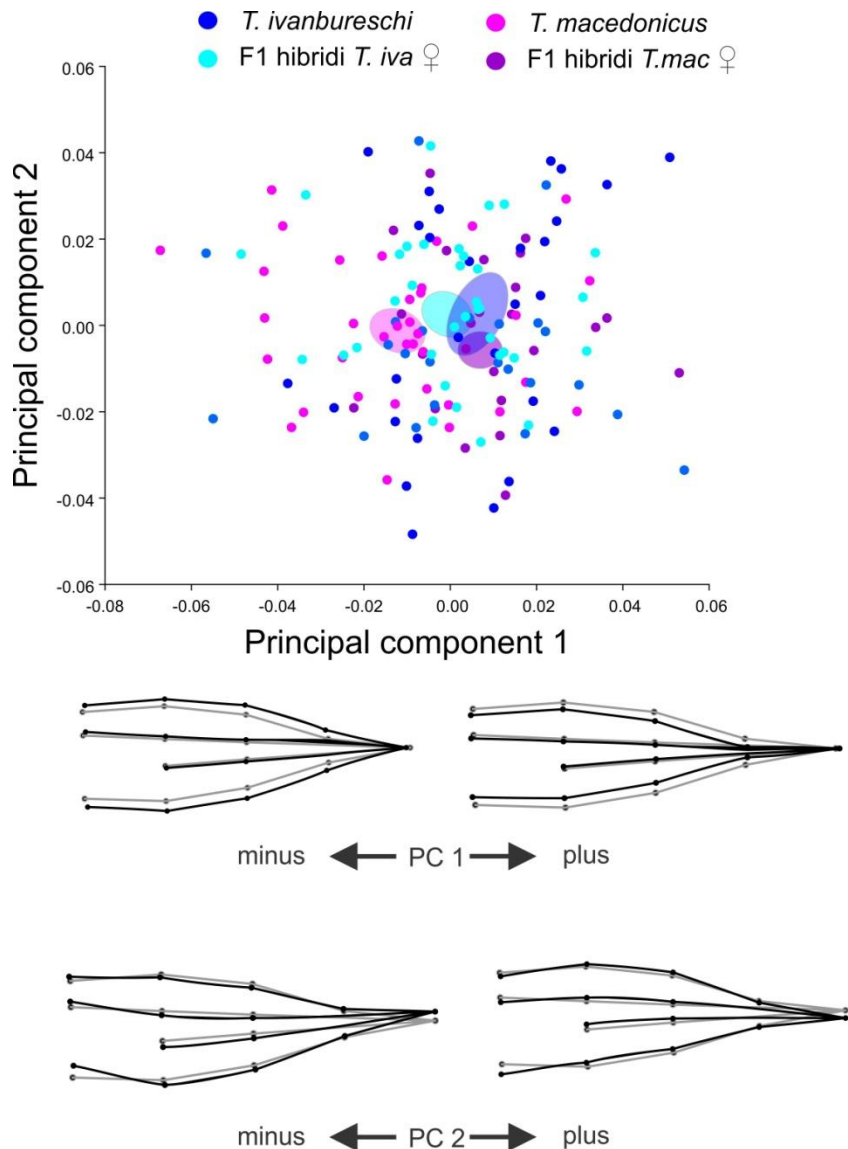
### 4.2.1 Spoljašnja morfologija repa

ANCOVA testom (Tabela 8) utvrđene su statistički značajne razlike među ispitivanim grupama za dužinu repa (DR) i visinu mišića repa (VMR), ali ne i za maksimalnu visinu repa (MVR). Međusobnim poređenjem utvrđeno je da se po dužini repa statistički značajno razlikuju samo *T. macedonicus* i F1 hibridi čije su majke *T. macedonicus* ( $P < 0,05$ ). U slučaju maksimalne visine repa, *T. ivanbureschi* se značajno razlikuje od svih ostalih grupa ( $P < 0,01$  u svim poređenjima), dok razlika nije utvrđena između *T. macedonicus* i hibridnih grupa ( $P > 0,05$  u svim poređenjima).

Varijabilost u obliku repa kao i međusobni odnosi analiziranih grupa utvrđeni su analizom glavnih komponenti. Prve dve ose glavnih komponenti (PC1 i PC2) opisuju 57,31% ukupne varijabilnosti oblika repa (Slika 18). Na prvoj osi po obliku repa izdvaja se *T. macedonicus*. Larve *T. macedonicus* imaju kraći ali širi rep. PC2 osa uglavnom opisuje unutargrupnu varijabilnost u orijentaciji vrha repa (ka gore ili ka dole). Statistički značajne razlike u obliku repa potvrđene su za skoro sve poređene parove, osim za hibridne grupe koje se međusobno ne razlikuju. Najveća Prokrastova distanca među srednjim oblicima pronađena je među roditeljskim vrstama (Tabela 9).

Tabela 8. Srednje vrednosti (SV) sa standardnom greškom (SE) merenih osobina: dužina tela od vrha njuške do kloake (SVL), veličina repa (CS), dužina tela (DT), maksimalna visina repa (MVR) i visina mišića repa (VMR) za četiri analizirane grupe: *T. ivanbureschi* (*T. iva*), *T. macedonicus* (*T. mac*), F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki (F1 hib *T. iva*), F1 hibridi *T. macedonicus* majki (F1 hib *T. mac*). Rezultati ANCOVA testa za poređenje ovih osobina među četiri grupe (SVL kao kovarijabla; merene osobine kao zavisne varijable).

	<i>T. iva</i>	<i>T. mac</i>	F1 hib <i>T. iva</i>	F1 hib <i>T. mac</i>	ANCOVA		
	(N = 32)	(N = 36)	(N = 35)	(N = 47)	d.f.	<i>F</i>	<i>P</i>
	SV ± SE (mm)	SV ± SE (mm)	SV ± SE (mm)	SV ± SE (mm)			
SVL	17,83 ± 0,37	19,00 ± 0,35	20,04 ± 0,24	18,97 ± 0,18			
CS	22,51 ± 0,54	22,86 ± 0,54	25,17 ± 0,37	24,38 ± 0,31	3	6,18	< 0,001
DR	21,68 ± 0,56	21,89 ± 0,25	24,28 ± 0,37	23,55 ± 0,31	3	6,57	< 0,001
MVR	6,34 ± 0,13	6,77 ± 0,08	7,03 ± 0,11	6,84 ± 0,09	3	2,14	0,098
VRM	2,16 ± 0,07	1,73 ± 0,05	1,91 ± 0,04	1,81 ± 0,04	3	17,2	< 0,001



Slika 18. Položaj jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvim dvema glavnim komponentama (PC1 i PC2). Elipse opisuju interval poverenja srednje vrednosti za datu grupu i odgovaraju verovatnoći od 75% da će se srednja vrednost ponovnog uzorkovanja preklopiti sa izračunatom srednjom vrednošću oblika repa za grupu. Donji grafikoni opisuju promene oblika repa jedinki sa maksimalnim skorovima na PC1 i PC2 osama (siva boja – srednji oblik; crna – oblik koji odgovara maksimalnim pozitivnim i negativnim skorovima duž PC1 i PC2 ose). Analizirane grupe: *T. ivanbureschi* (*T. iva*), *T. macedonicus* (*T. mac*), F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki (F1 hib *T. iva*), F1 hibridi *T. macedonicus* majki (F1 hib *T. mac*) (prilagođeno iz Vučić i sar. 2018).

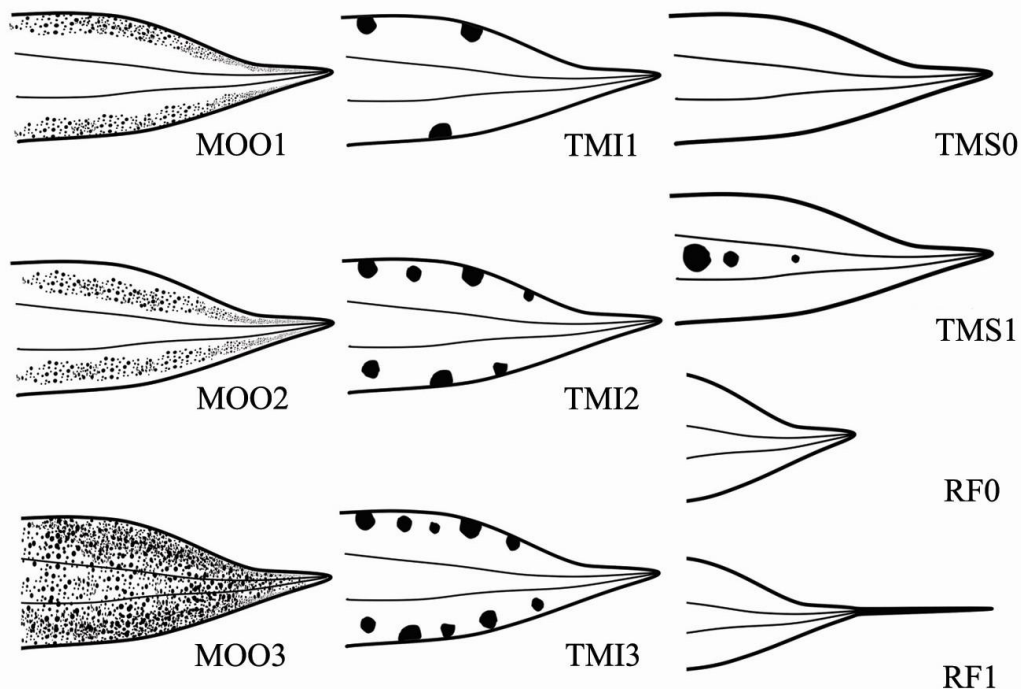


Tabela 9. Prokrastove distance (PD) i *P* vrednosti dobijene permutacionim testovima (1000 ponavljanja sa Bonferoni korekcijom za višestruka poređenja). Analizirane grupe: *T. ivanbureschi* (*T. iva*), *T. macedonicus* (*T. mac*), F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki (F1 hib *T. iva*), F1 hibridi *T. macedonicus* majki (F1 hib *T. mac*).

Poređene grupe	PD	<i>P</i>
<i>T. iva</i> - <i>T. mac</i>	0,029	< 0,001
F1 hib <i>T. iva</i> - <i>T. iva</i>	0,022	< 0,001
F1 hib <i>T. iva</i> - <i>T. mac</i>	0,025	< 0,001
F1 hib <i>T. mac</i> - <i>T. mac</i>	0,026	< 0,001
F1 hib <i>T. mac</i> - <i>T. iva</i>	0,022	< 0,001
F1 hib <i>T. iva</i> - F1 hib <i>T. mac</i>	0,010	0,180

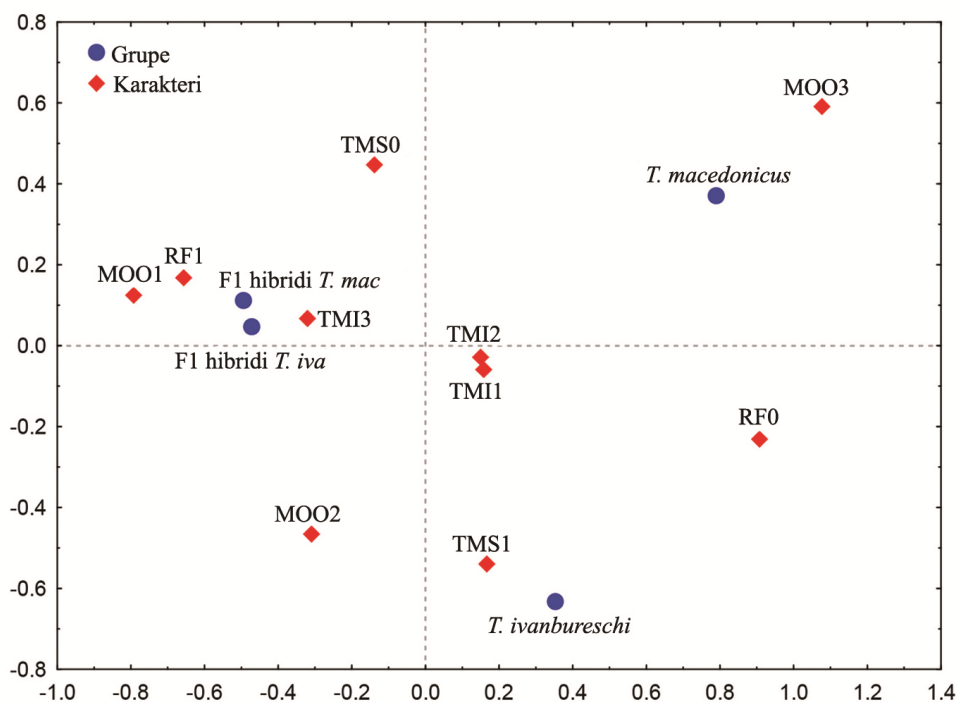
Utvrđena su sledeća stanja karaktera za obrasce obojenosti i prisutnost repnog filameta (Slika 19):

- 1) mramorasti obrazac obojenosti (MOO): blizu ivice repa (1), na ventralnim i dorzalnim delovima repa (2), uniformno na obe strane (3);
- 2) broj tamnih mrlja na ivicama repa (TMI): retke,  $n = 0 - 5$  (1), srednje,  $n = 6 - 9$  (2), brojne,  $n > 10$  (3);
- 3) prisutnost tamnih mrlja na središnjem delu repa (TMS): odsutne (0), prisutne (1);
- 4) prisutnost repnog filameta (RF): odustan (0), prisutan (1).



Slika 19. Shematski prikaz stanja karaktera za odabrane osobine repa: mramorasti obrazac obojenosti (MOO), broj tamnih mrlja na ivicama repa (TMI), prisutnost tamnih mrlja na središnjem delu repa (TMS) i prisutnost repnog filameta (RF). Za detaljnije objašnjenje stanja karaktera pogledati tekst (prilagođeno iz Vučić i sar. 2018).

Položaj jedinki u odnosu na prve dve ose dobijene korespondentnom analizom prikazan je na Slici 20. Recipročni hibridi se grupišu zajedno. Karakteri čije učestalosti najviše doprinose odvajanju hibrida od roditeljskih vrsta jesu prisustvo repnog filameta (RF1), pozicija mramorastog obrasca obojenosti (MOO1) i prisustvo brojnih mrlja na ivicama repa (TMI3). Prisustvo tamnih mrlja u nivou repnog mišića na središnjem delu repa (TMS1) je karakter koji najviše doprinosi razdvajanju *T. ivanbureschi* od ostalih grupa. Larve *T. macedonicus* imaju uniformno mramorasto obojeni rep (MOO3) (Slika 20).



Slika 20. Korespondentna analiza: pozicija četiri analizirane grupe u odnosu na analizirane osobine. Analizirane grupe: *T. ivanbureschi*, *T. macedonicus*, F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki (F1 hibridi *T. iva*), F1 hibridi *T. macedonicus* majki (F1 hibridi *T. mac*). Analizirane osobine repa: mramorasti obrazac obojenosti (MOO), broj tamnih mrlja na ivicama repa (TMI), prisutnost tamnih mrlja na središnjem delu repa (TMS) i prisutnost repnog filameta (RF) (prilagođeno iz Vučić i sar. 2018).

Potvrđene su statistički značajne razlike u učestalosti stanja karaktera među testiranim grupama: MOO (G test = 119,49;  $P < 0.001$ ), TMI (G test = 14,14;  $P < 0.05$ ), TMS (G test = 45,37;  $P < 0.001$ ) i RF (G test = 108,97;  $P < 0.001$ ). Međugrupnim poređenjima (Tabela 10) utvrđene su razlike u obrascu mramoraste obojenosti (MOO) među skoro svim grupama, osim između recipročnih hibrida. Hibridi *T. macedonicus* majki razlikuju se od hibrida *T. ivanbureschi* majki, kao i od *T. macedonicus*, ali ne od *T. ivanbureschi* po učestalosti stanja karaktera TMI (količina tamnih mrlja na ivici repa). Larve *T. ivanbureschi* razlikuju se od svih ostalih grupa po prisustvu tamnih mrlja na središnjem delu repa (TMS1). Repni filament, prisutan kod obe hibridne grupe, razlikuje hibride od roditeljskih vrsta.

Tabela 10. Poređenje učestalosti stanja karaktera osobina repa: mramorasti obrazac obojenosti (MOO), broj tamnih mrlja na ivicama repa (TMI), prisutnost tamnih mrlja na središnjem delu repa (TMS) i prisutnost repnog filameta (RF). Analizirane grupe: *T. ivanbureschi* (*T. iva*), *T. macedonicus* (*T. mac*), F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki (F1 hib *T. iva*), F1 hibridi *T. macedonicus* majki (F1 hib *T. mac*).

Poređene grupe	MOO		TMI		TMS		RF	
	G test	<i>P</i>	G test	<i>P</i>	G test	<i>P</i>	G test	<i>P</i>
<i>T. iva</i> - <i>T. mac</i>	45,25	< 0,001	0,09	0,950	31,35	< 0,001	< 0,05	0,840
F1 hib <i>T. iva</i> - <i>T. iva</i>	12,76	< 0,001	5,33	0,070	21,49	< 0,001	53,01	< 0,001
F1 hib <i>T. iva</i> - <i>T. mac</i>	67,43	< 0,001	5,75	0,060	1,13	0,290	58,39	< 0,001
F1 hib <i>T. mac</i> - <i>T. mac</i>	87,15	< 0,001	6,61	< 0,050	0,25	0,620	55,58	< 0,001
F1 hib <i>T. mac</i> - <i>T. iva</i>	14,52	< 0,001	4,77	0,090	40,03	< 0,001	49,68	< 0,001
F1 hib <i>T. iva</i> - F1 hib <i>T. mac</i>	0,76	0,680	6,68	< 0,050	2,66	0,100	1,11	0,290

#### 4.2.2 Veličina i oblik glave

Prosečna veličina glave (Tabela 1) razlikovala se među grupama na svim ispitivanim stupnjevima (ANOVA,  $P < 0,0001$ ). Larve *T. ivanbureschi* odlikuju se najmanjom glavom, dok *T. macedonicus* larve imaju najveću glavu na skoro svim stupnjevima osim na četvrtom analiziranom stupnju (St. 61). Veličina glave hibrida uglavnom ima vrednosti između vrednosti roditeljskih vrsta, osim na četvrtom analiziranom stupnju (St. 61) kada su vrednosti oba hibrida veće od roditeljskih vrsta. Međugrupna poređenja (Tukijev test, Tabela 11) pokazala su statistički značajne razlike u veličini glave *T. ivanbureschi* i *T. macedonicus* larvi na svim analiziranim stupnjevima. Hibridne grupe se uglavnom ne razlikuju međusobno, osim na četvrtom stupnju (St. 61) kada hibridi čije su majke *T. macedonicus* imaju veće glave od svih ostalih grupa.

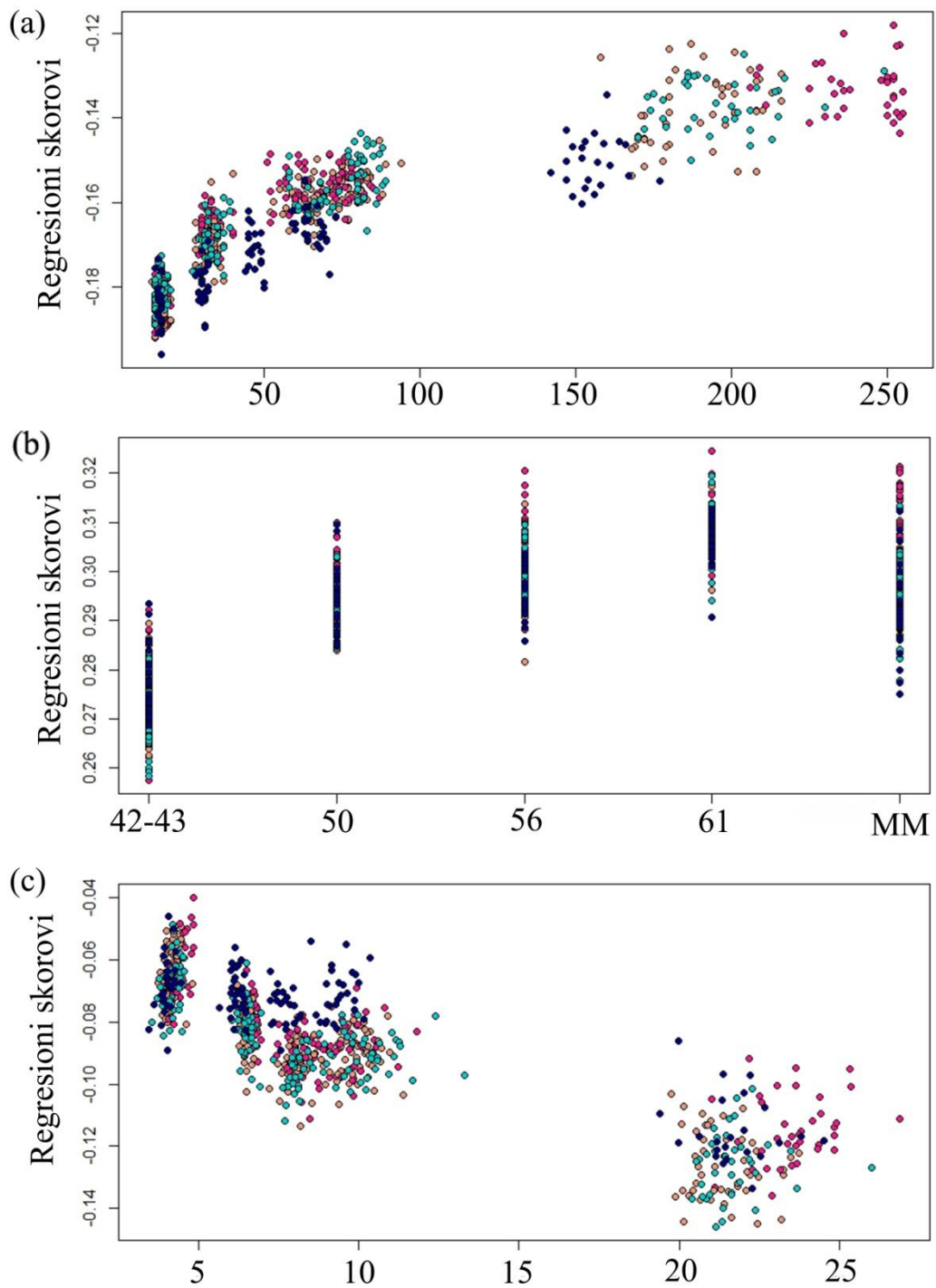
Tabela 11. Međugrupna poređenja (Tukijev test) veličine glave (CS) na pet ontogenetskih stupnjeva. Analizirane grupe: *T. ivanbureschi* (*T. iva*), *T. macedonicus* (*T. mac*), F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki (F1 hib *T. iva*), F1 hibridi *T. macedonicus* majki (F1 hib *T. mac*).

Poređene grupe	Ontogenetski stupanj				
	42-43	50	56	61	MJ
<i>T. iva</i> - <i>T. mac</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,011	< 0,001
F1 hib <i>T. iva</i> - <i>T. iva</i>	0,022	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,999
F1 hib <i>T. iva</i> - <i>T. mac</i>	0,111	< 0,001	< 0,001	0,001	0,622
F1 hib <i>T. mac</i> - <i>T. mac</i>	< 0,001	< 0,001	0,068	0,966	< 0,001
F1 hib <i>T. mac</i> - <i>T. iva</i>	0,004	< 0,001	0,992	0,003	< 0,001
F1 hib <i>T. iva</i> - F1 hib <i>T. mac</i>	0,817	0,940	0,155	0,011	0,571

Regresioni skorovi varijabli oblika (simetrične komponente) dobijeni multivarijantnom regresijom varijabli oblika glave na starost u danima (Slika 21a) pokazuju sličan trend za sve analizirane grupe. Sukcesivni ontogenetski stupnjevi jasno su razdvojeni. Primetna je divergencija *T. ivanbureschi* počevši od drugog analiziranog stupnja (St. 50), tako da hronološki dostižu treći stupanj pre ostalih grupa. Na četvrtom

stupnju (St. 61) oblik glave *T. ivanbureschi* larvi je sličan obliku glave ostalih grupa na trećem stupnju (St. 56) kada su slične starosti. Dobijeni rezultat ukazuje da je stopa razvića *T. ivanbureschi* larvi viša nego kod *T. macedonicus* i hibrida. Regresioni skorovi varijabli oblika na ontogenetski stupanj (Slika 21b) takođe su slični za sve analizirane grupe. Larve *T. ivanbureschi* divergiraju na trećem (St. 56), četvrtom (St. 61) i stupnju nakon metamorfoze, dok se vrednosti oblika preklapaju na prva dva stupnja (St. 42-43 i 50). Rezultati obe regresije ukazuju da *T. ivanbureschi* larve divergiraju nakon 50. stupnja, kada kreću da se razvijaju zadnji ekstremiteti, i da se ta razlika održava i nakon metamorfoze.

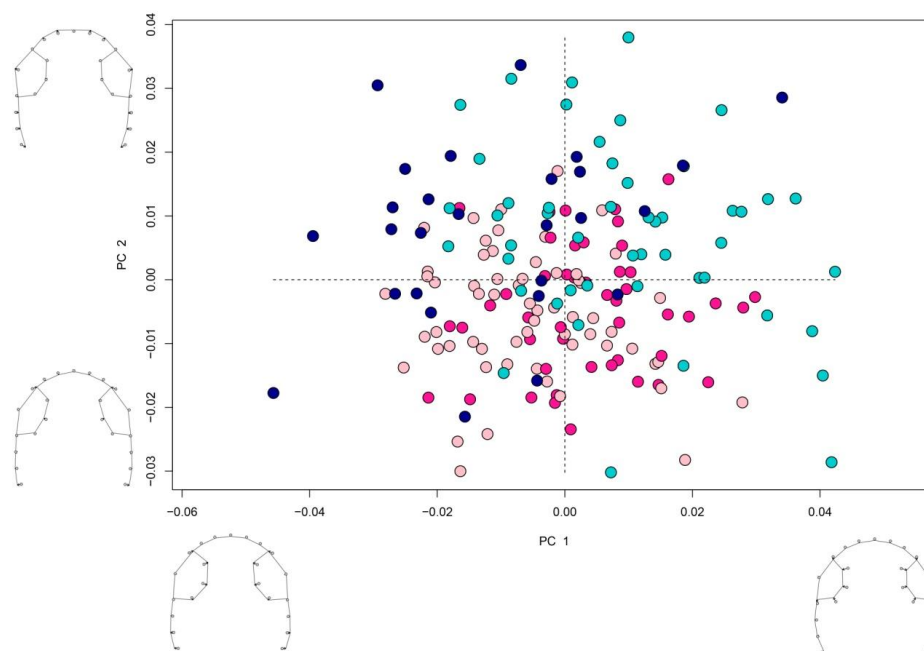
Regresioni skorovi varijabli oblika na veličinu glave (Slika 21c) takođe su slični za sve analizirane grupe, što ukazuje da obe vrste, kao i njihovi hibridi, imaju sličan trend alometrijskih promena oblika glave. Međutim, sa porastom veličine glave dolazi do razdvajanja *T. ivanbureschi* i ostalih grupa dovodeći do razlike u odnosu veličine i oblika na kasnijim larvenim stupnjevima i stupnju nakon metamorfoze.



Slika 21. Multivarijantna regresija varijabli oblika (simetrične komponente) na (a) hronološku starost izraženu u danima; (b) ontogenetski stupanj i (c) veličinu glave (veličinu centroida – CS). Skraćenica: MM – stupanj nakon metamorfoze.

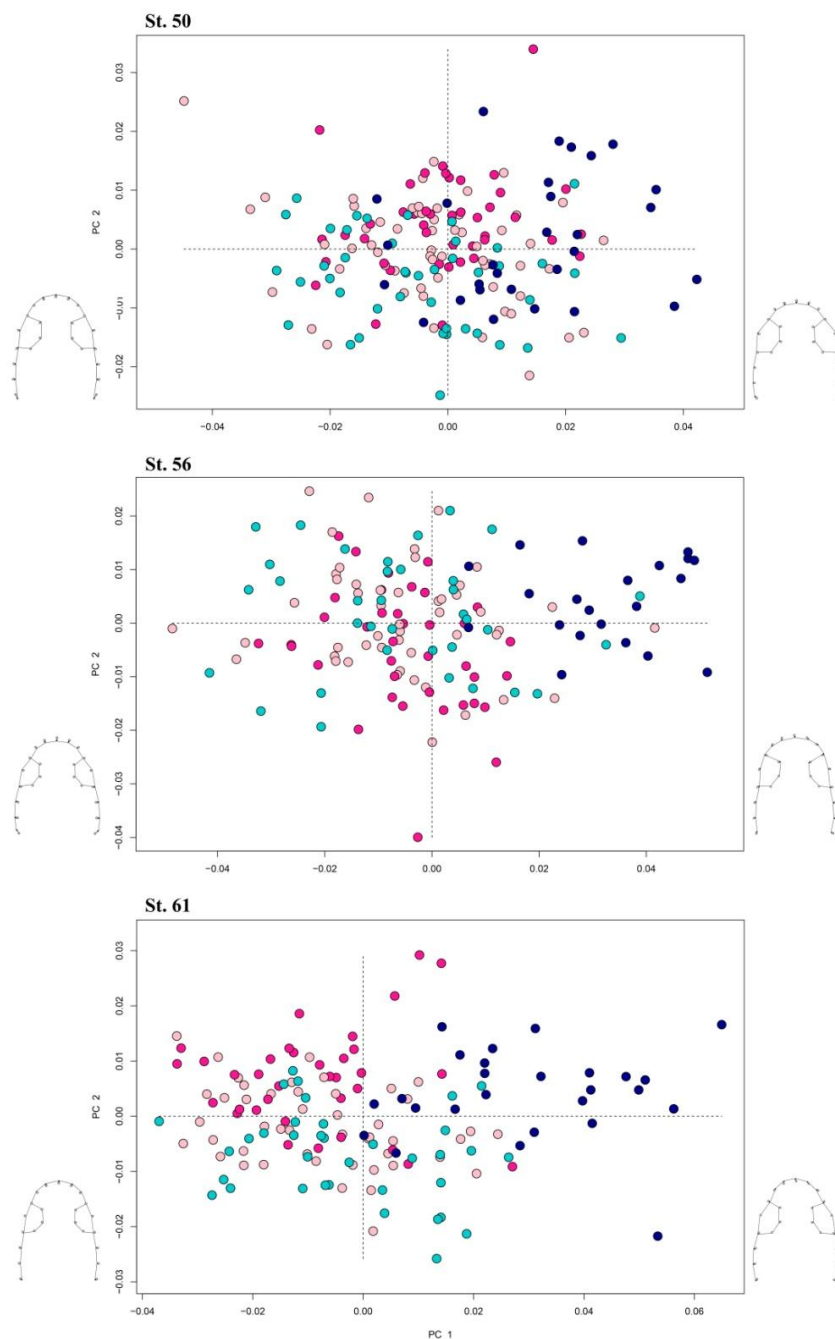
### 4.2.3 Ontogenetski obrasci promene oblika glave

Prve dve glavne komponente opisuju 55,19% ukupne varijabilnosti u obliku glave na prvom analiziranom stupnju (St. 42-43) ukazujući na znatno preklapanje među grupama (Slika 22). Roditeljske vrste su međusobno razdvojene, dok su hibridi pozicionirani između njih. Glavna razlika u obliku glave po izvaljivanju povezana je sa varijacijom u veličini očiju i obliku posterionog dela glave. Od drugog do četvrtog analiziranog stupnja (St. 50, 56 i 61), larve *T. ivanbureschi* su jasno odvojene od ostalih grupa po prvoj osi izrazito zaobljenom glavom (Slika 23). Na stupnju po metamorfozi, *T. ivanbureschi* i *T. macedonicus* su jasno odvojeni, dok su hibridi grupisani zajedno između roditeljskih vrsta (u morfološkom prostoru koji opisuje 63,25% ukupne varijabilnosti). Glavna odlika koja razdvaja roditeljske vrste je veličina očiju i posteriornog dela glave, dok hibride od roditeljskih vrsta odvaja zaobljenija glava (Slika 24).

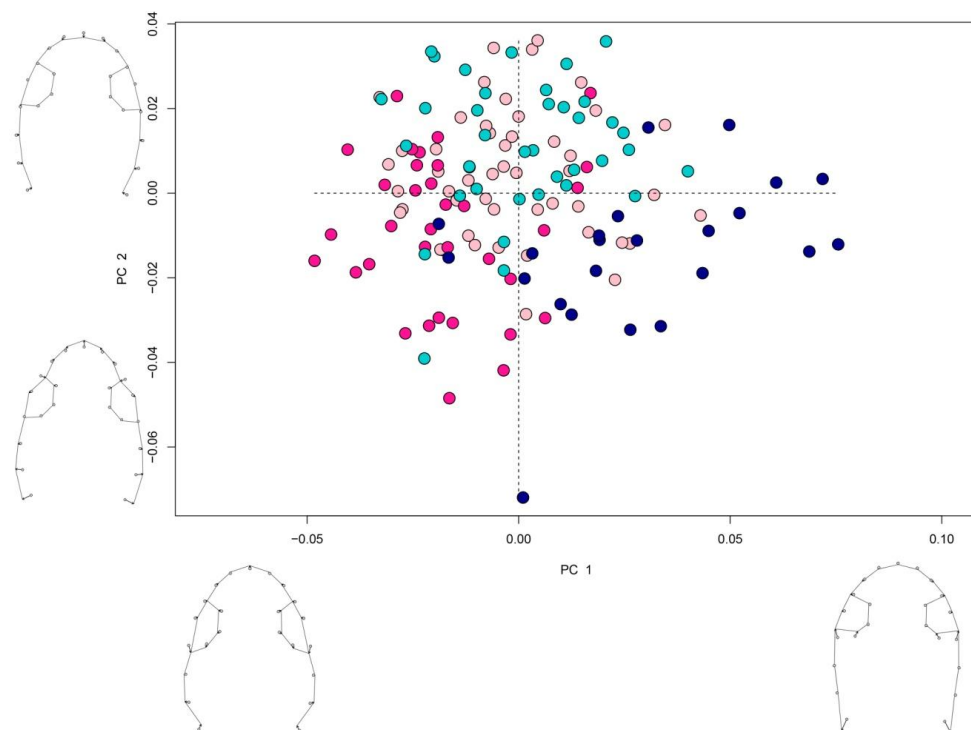


Slika 22. Pozicija tek izvaljenih larvi (ontogenetski stupanj 42-43) u morfološkom prostoru definisanom sa prve dve glavne komponente (PC1 i PC2). Analizirane grupe: *T. ivanbureschi* (tamno plava boja na grafiku), *T. macedonicus* (ciklama), F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki (svetlo plavo), F1 hibridi *T. macedonicus* majki (svetlo roze) (Vučić i sar. 2019).





Slika 23. Pozicija larvi (ontogenetski stupnjevi 50, 56 i 61) u morfološkom prostoru definisanom sa prve dve glavne komponente (PC1 i PC2). Analizirane grupe: *T. ivanbureschi* (tamno plava boja na grafiku), *T. macedonicus* (ciklama), F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki (svetlo plavo), F1 hibridi *T. macedonicus* majki (svetlo roze) (Vučić i sar. 2019).



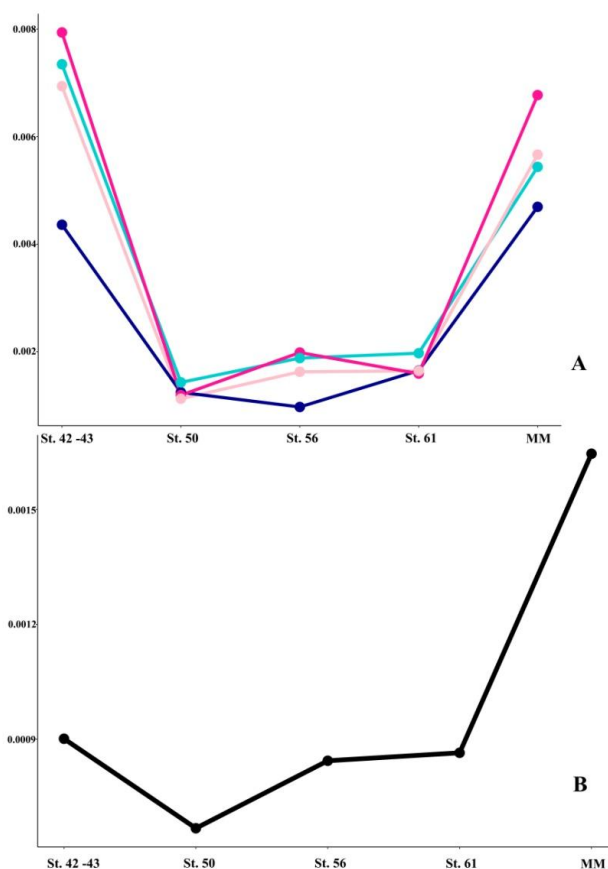
Slika 24. Pozicija metamorfoziranih juvenilaca u morfološkom prostoru definisanom sa prve dve glavne komponente (PC1 i PC2). Analizirane grupe: *T. ivanbureschi* (tamno plava boja na grafiku), *T. macedonicus* (ciklama), F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki (svetlo plavo), F1 hibridi *T. macedonicus* majki (svetlo roze) (Vučić i sar. 2019).

Međugrupnim poređenjem Prokrastovih distanci (Tabela 12) utvrđeno je da se *T. ivanbureschi* i *T. macedonicus* značajno razlikuju u obliku glave na svim ispitivanim stupnjevima sa najvećom razlikom na stupnju nakon završetka metamorfoze. Hibridi se uglavnom razlikuju od obe roditeljske vrste tokom ontogenije, osim u slučaju hibrida *T. macedonicus* majki i *T. macedonicus* na svim larvalnim stupnjevima. Po završetku metamorfoze ove dve grupe divergiraju u obliku glave. Hibridne grupe se međusobno razlikuju po izvaljivanju larvi (St. 42-43) i kao metamorfozirane juvenilne jedinke, ali ne i na larvenim stupnjevima između prethodno navedenih (St. 50, 56 i 61).

Tabela 12. Prokrastove distance (PD) i *P* vrednosti dobijene permutacionim testovima (1000 ponavljanja i Bonferoni korekcija za višestruka poređenja). Analizirane grupe: *T. ivanbureschi* (*T. iva*), *T. macedonicus* (*T. mac*), F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki (F1 hib *T. iva*), F1 hibridi *T. macedonicus* majki (F1 hib *T. mac*). Skraćenice: MJ – metamorfozirane juvenilne jedinke.

Poređene grupe	St. 42-43		St. 50		St. 56		St. 61		MJ	
	PD	<i>P</i>	PD	<i>P</i>	PD	<i>P</i>	PD	<i>P</i>	PD	<i>P</i>
<i>T. iva</i> - <i>T. mac</i>	0,025	< 0,001	0,033	< 0,001	0,044	< 0,001	0,042	< 0,001	0,063	< 0,001
F1 hib <i>T. iva</i> - <i>T. iva</i>	0,020	< 0,001	0,030	< 0,001	0,044	< 0,001	0,042	< 0,001	0,040	< 0,001
F1 hib <i>T. iva</i> - <i>T. mac</i>	0,020	< 0,001	0,030	< 0,001	0,042	< 0,001	0,041	< 0,001	0,037	< 0,001
F1 hib <i>T. mac</i> - <i>T. mac</i>	0,007	0,874	0,007	0,296	0,012	0,074	0,010	0,332	0,040	< 0,001
F1 hib <i>T. mac</i> - <i>T. iva</i>	0,020	< 0,001	0,015	< 0,001	0,015	0,014	0,018	0,002	0,042	< 0,001
F1 hib <i>T. iva</i> - F1 hib <i>T. mac</i>	0,019	< 0,001	0,008	0,159	0,006	1,000	0,011	0,208	0,010	< 0,001

Sve četiri grupe pokazale su sličan obrazac promene varijanse (unutargrupne varijabilnosti u obliku glave) tokom ontogenije (Slika 25a). Najveća vrednost varijanse karakteriše stupanj po izvaljivanju (St. 42-43) i stupanj nakon metamorfoze. Kod svih grupa statistička značajnost razlike u varijansi pronađena je između stupnja po izvaljivanju (St. 42-43) i larvenog stupnja (St. 50), kao i između poslednjeg larvalnog (St. 61) i stupnja nakon završetka metamorfoze ( $P < 0,001$  u svim međusobnim poređenjima). Kada je u pitanju međugrupna varijansa (disparitet), stupanj nakon izvaljivanja i svi larveni stupnjevi (St. 42-43, 50, 56 i 61) karakterišu se uniformnim nivoom dispariteta. Nagli porast dispariteta zabeležen je na stupnju nakon završetka metamorfoze (Slika 25b).



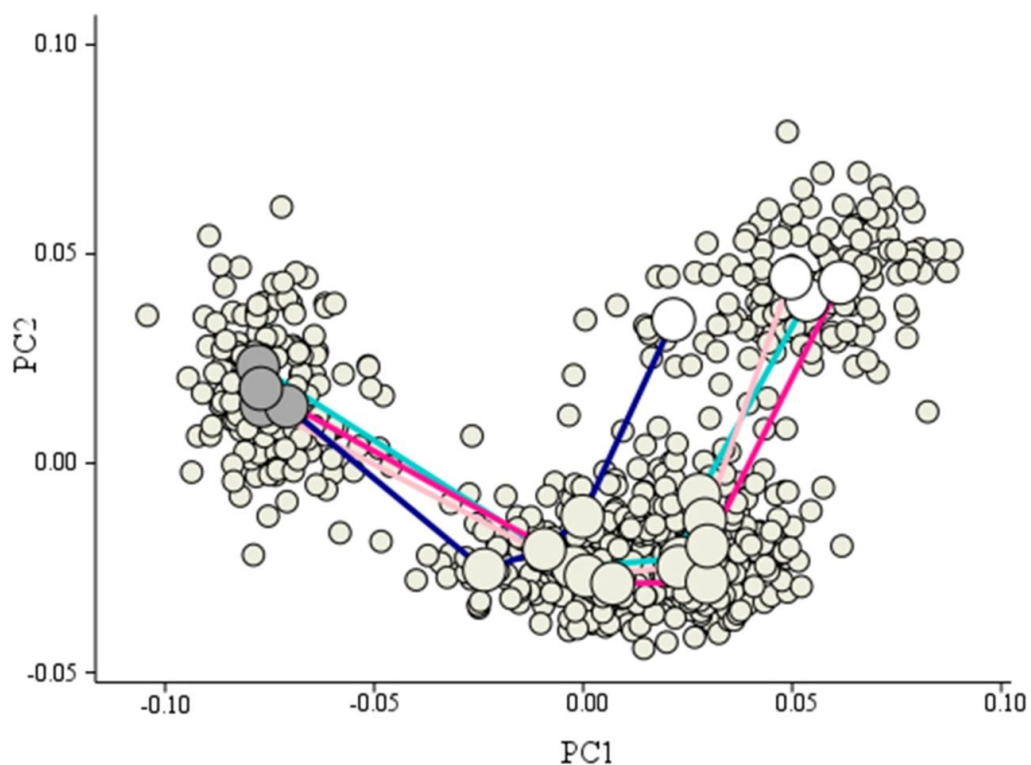
Slika 25. (a) Ontogenetske promene varijanse (unutargrupna varijabilnost). Analizirane grupe: *T. ivanbureschi* (tamno plava boja na grafiku), *T. macedonicus* (ciklama), F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki (svetlo plavo), F1 hibridi *T. macedonicus* majki (svetlo roze). (b) Ontogenetske promene nivoa morfološkog dispariteta (međugrupna varijabilnost) (Vučić i sar. 2019).

#### 4.2.4 Ontogenetske trajektorije

Analizom fenotipskih trajektorija pokazano je da svaka grupa prati svoju, distinktnu ontogenetsku putanju (Slika 26) sa statistički značajnim razlikama među svim ispitanim atributima trajektorija (pozicija, veličina odnosno dužina, pravac i oblik). Razlikama u poziciji trajektorija doprinose grupa, stupanj kao i njihova interakcija ( $P < 0,001$  za sve faktore). Kroz najveću promenu oblika glave (dužina trajektorije), od izvaljivanja do završetka metamorfoze, prolazi *T. macedonicus* (dužina trajektorije: 0,222), dok se najmanje menja oblik glave *T. ivanbureschi* (0,183). U poređenju sa roditeljskim vrstama, F1 hibridi imaju srednje vrednosti dužina trajektorije (F<sub>1</sub> *T. ivanbureschi* majki: 0,216; F<sub>1</sub> *T. macedonicus* majki: 0,204). Međugrupno poređenje pokazalo je da slične dužine putanja imaju *T. macedonicus* i hibridi *T. ivanbureschi* majki ( $P = 0,394$ ), dok se dve hibridne grupne marginalno razlikuju ( $P = 0,05$ ). Sva ostala poređena su statistički značajna ( $P < 0,01$ ). Međugrupna poređenja uglova pokazala su da se sve grupe međusobno razlikuju u pravcu trajektorija (Tabela 13). Ontogenetske trajektorije imaju sličan opšti trend, sa najvećom promenom između 56. i 61. stupnja (Slika 26). Međutim, međugrupno poređene Prokrastovih distanci između trajektorija, pokazalo je da su po obliku zapravo slični samo *T. macedonicus* i hibrid *T. macedonicus* majki, dok su sva ostala poređenja statistički značajna (Tabela 13).

Tabela 13. Međugrupno poređenje atributa ontogenetskih trajektorija dobijenih analizom fenotipskih trajektorija (PTA).

Poređene grupe	Pravac trajektorije		Oblik trajektorije	
	Ugao	<i>P</i>	PD	<i>P</i>
<i>T. iva</i> - <i>T. mac</i>	18,70	< 0,001	0,201	< 0,001
F1 hib <i>T. iva</i> - <i>T. iva</i>	18,70	< 0,001	0,226	< 0,001
F1 hib <i>T. iva</i> - <i>T. mac</i>	16,87	< 0,001	0,203	< 0,001
F1 hib <i>T. mac</i> - <i>T. mac</i>	11,13	< 0,001	0,079	0,143
F1 hib <i>T. mac</i> - <i>T. iva</i>	8,03	< 0,001	0,146	< 0,001
F1 hib <i>T. iva</i> - F1 hib <i>T. mac</i>	9,40	< 0,001	0,093	0,039



Slika 26. Ontogenetske trajektorije prikazane kao linije koje su različito obojene u zavisnosti od grupe. Linije povezuju tačke koje predstavljaju srednje vrednosti oblika glave na sukcesivnim ontogenetskim stupnjevima u morfološkom prostoru opisanom dvema glavnim komponentama. Početna tačka (srednji oblik glave tek izvaljenih larvi; stupanj 42-43) je predstavljena tamno sivim krugovima. Krajnja tačka (srednji oblik glave metamorfoziranih juvenilaca) predstavljena je belim krugom. Analizirane grupe: *T. ivanbureschi* (tamno plava boja na grafiku), *T. macedonicus* (ciklama), F1 hibridi *T. ivanbureschi* majki (svetlo plavo), F1 hibridi *T. macedonicus* majki (svetlo roze) (Vučić i sar. 2019).

### 4.3 Morfološka varijabilnost adultnih jedinki

#### 4.3.1 Oblik glavenog skeleta

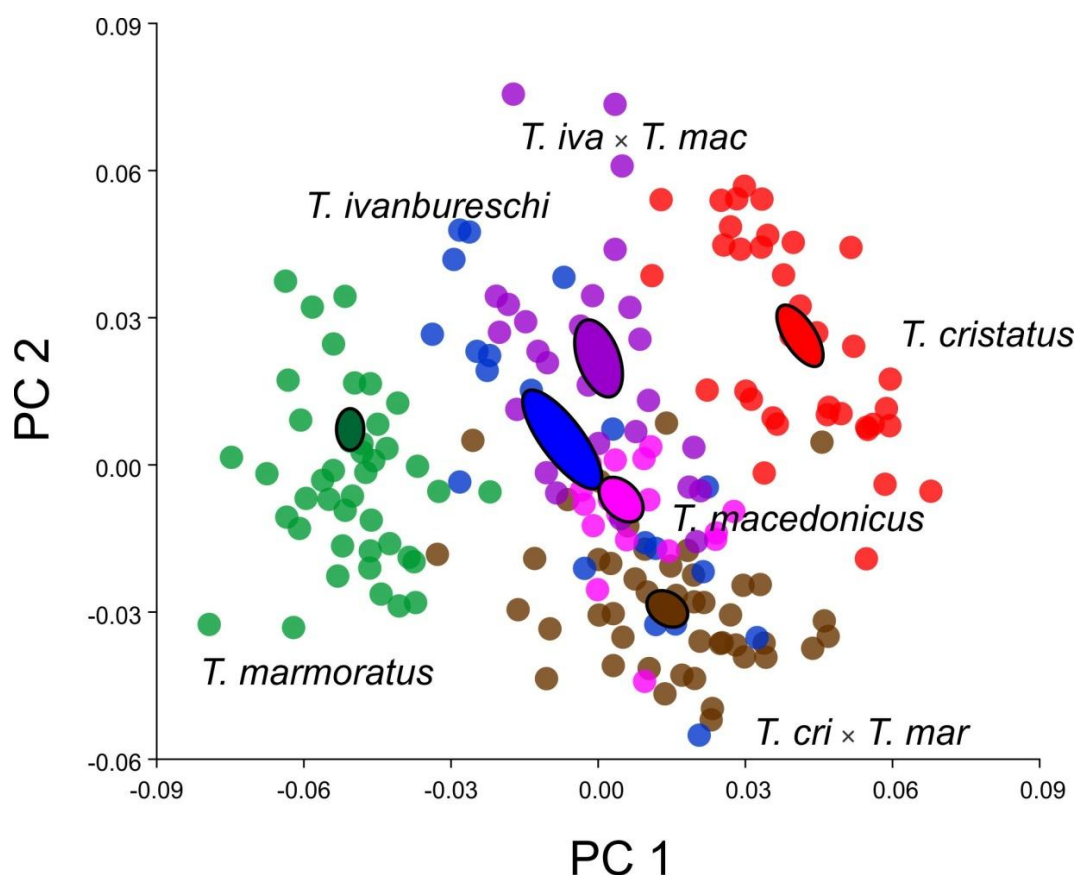
Analizom glavnih komponenti utvrđeno je da prve dve glavne komponente (PC1 i PC2) opisuju oko 41% ukupne varijabilnosti oblika glavenog skeleta (Tabela 14).

Tabela 14: Sopstvene vrednosti (engl. *Eigenvalues*) i procenat varijabilnosti opisan sopstvenim vrednostima dobijenim analizom glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis* – PCA).

PC osa	Sopstvena vrednost	% varijabilnosti	Kumulativni % varijabilnosti
1	0,001159	24,632	24,632
2	0,000760	16,158	40,790
3	0,000475	10,098	50,888
4	0,000342	7,259	58,147
5	0,000261	5,549	63,696
6	0,000223	4,730	68,426
7	0,000184	3,908	72,334
8	0,000156	3,320	75,655
9	0,000125	2,657	78,312
10	0,000111	2,352	80,664
11	0,000109	2,312	82,976
12	0,000091	1,940	84,916
13	0,000081	1,717	86,633
14	0,000072	1,530	88,164
15	0,000066	1,409	89,572
16	0,000062	1,326	90,899
17	0,000052	1,097	91,996
18	0,000050	1,056	93,051
19	0,000042	0,888	93,940
20	0,000040	0,849	94,788
21	0,000034	0,728	95,516

Po prvoj osi jasno se razdvajaju *T. marmoratus* i *T. cristatus*, dok su hibridi *T. cristatus* × *T. marmoratus* pozicionirani između roditeljskih vrsta. *Triturus ivanbureschi* i *T. macedonicus* se odvajaju po obe ose, ali su međusobno sličniji u odnosu na druge dve vrste. Hibridi *T. ivanbureschi* × *T. macedonicus* nalaze se između dve vrste po prvoj osi, ali se odvajaju od roditeljskih vrsta po drugoj osi. Dve grupe hibrida se jasno razlikuju po drugoj osi (Slika 27).

Razlike u obliku glavenog skeleta detaljnije su analizirane primenom CVA (Tabela 15).



Slika 27. Položaj jedinki u morfološkom prostoru definisanom prvim dvema glavnim komponentama (PC1 i PC2). Elipse opisuju interval poverenja srednje vrednosti za datu grupu i odgovaraju verovatnoći od 75% da će se srednja vrednost ponovnog (permutovanog) uzorka preklopiti sa izračunatom srednjom vrednošću oblika glavenog skeleta.



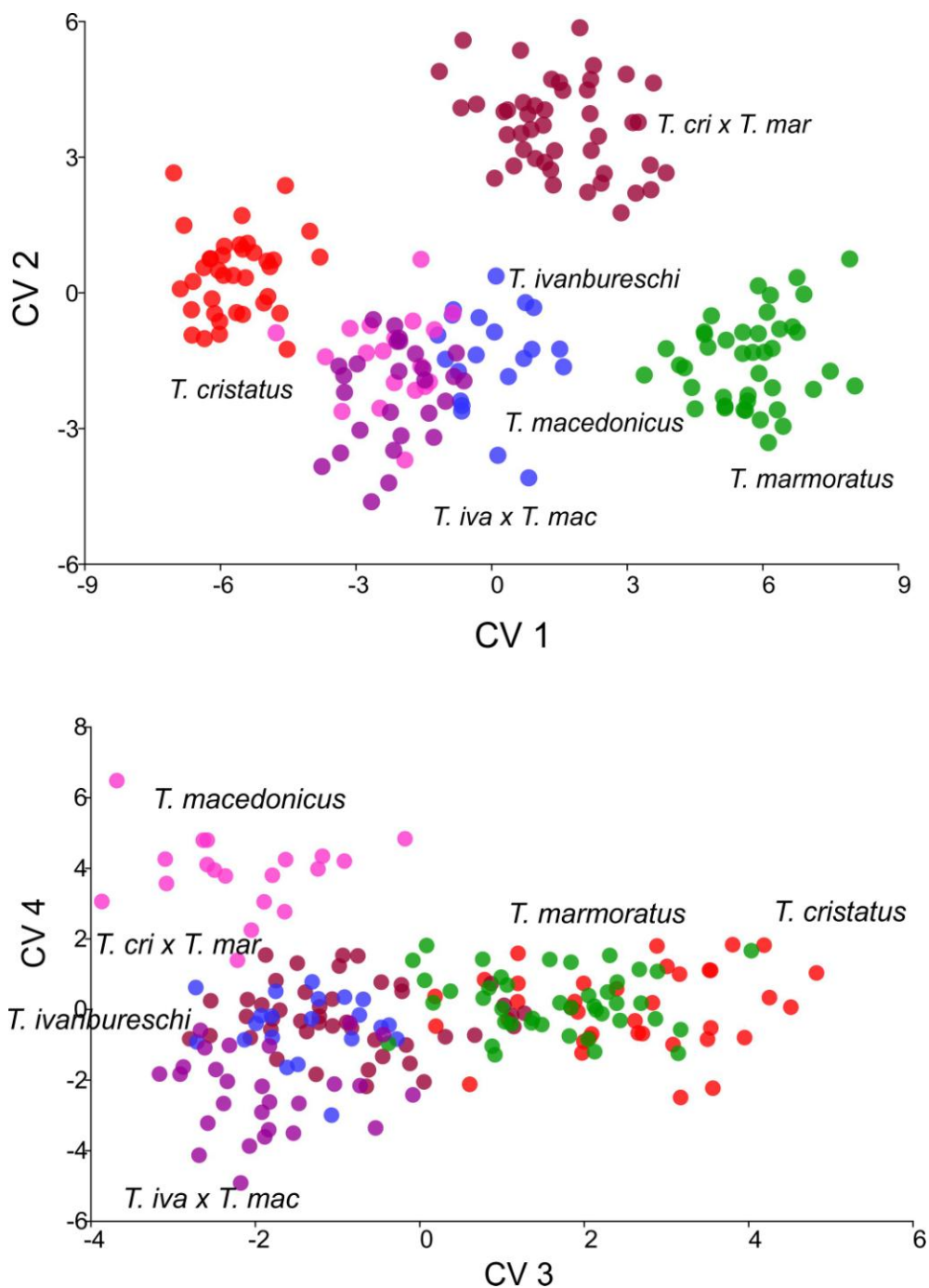
Tabela 15. Sopstvene vrednosti i procenat opisanih razlika među grupama dobijenih kanonijskom diskriminantnom analizom.

CV osa	Sopstvena vrednost	% varijabilnosti	Kumulativni % varijabilnosti
1	15,674	56,896	56,896
2	5,028	18,251	75,147
3	3,320	12,051	87,198
4	2,400	8,713	95,911
5	1,126	4,089	100,000

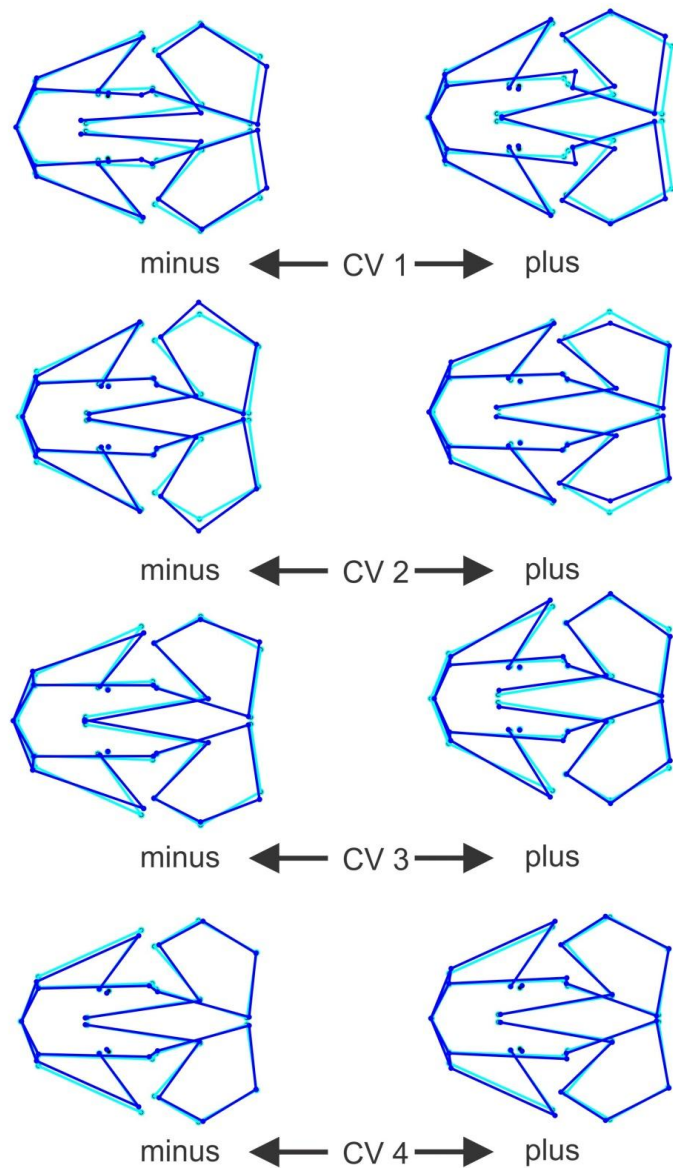
Morfološki prostor opisan CV osama ukazuje na jasno razdvajanje među grupama (Slika 28). Po CV1 osi koja opisuje skoro 57% ukupne varijabilnosti, razdvajaju se *T. cristatus* i *T. marmoratus*, dok se hibridi nalaze između.

Glavna razlika u obliku lobanje između ove dve vrste je u tome što *T. marmoratus* ima kraću i širu glavu, posebno u posteriornom, okcipitalnom delu, sa izraženim proširenjima frontalnih kostiju. Dve vrste se razlikuju i po položaju vomeralnih zuba (Slike 29 i 30). Hibrid *T. cristatus* × *T. marmoratus* se od roditeljskih vrsta, kao i od hibrida *T. ivanbureschi* × *T. macedonicus* izdvaja po drugoj CV osi. Hibridi *T. cristatus* × *T. marmoratus* imaju izduženiju i užu glavu, lobanja je znatno uža u nivou kvadratura (u nivou viličnog zgloba), dok su pterigoideumi više anteriorno usmereni. Vomeri i nizovi zuba na vomerima su duži nego kod roditeljskih vrsta, dok su premaksilarne kosti nešto krupnije (Slike 29 i 30). *Triturus ivanbureschi*, *T. macedonicus* i njihov hibrid su znatno međusobno sličniji. Hibrid *T. ivanbureschi* × *T. macedonicus* je prema obliku glavenog skeleta sličniji sa *T. macedonicus*, i od *T. ivanbureschi* se razlikuju po nešto izduženijem posteriornom delu i kraćim frontalnim proširenjima (Slike 29 i 30). U morfološkom prostoru opisanom CV3 i CV4 osama, po CV3 osi od ostalih grupa jasno se izdvajaju *T. cristatus* i *T. marmoratus* po šire postavljanim maksilama, dužim bočnim nastavcima frontalnih kostiju, užem okcipitalnom regionu i kraćim nizovima zuba na vomerima. Po CV4, od svih grupa izdvaja se *T. macedonicus* i to dužim premaksilarnim i maksilarnim kostima, kao i izraženijim bočnim nastavcima frontalne kosti (Slike 29 i 30).

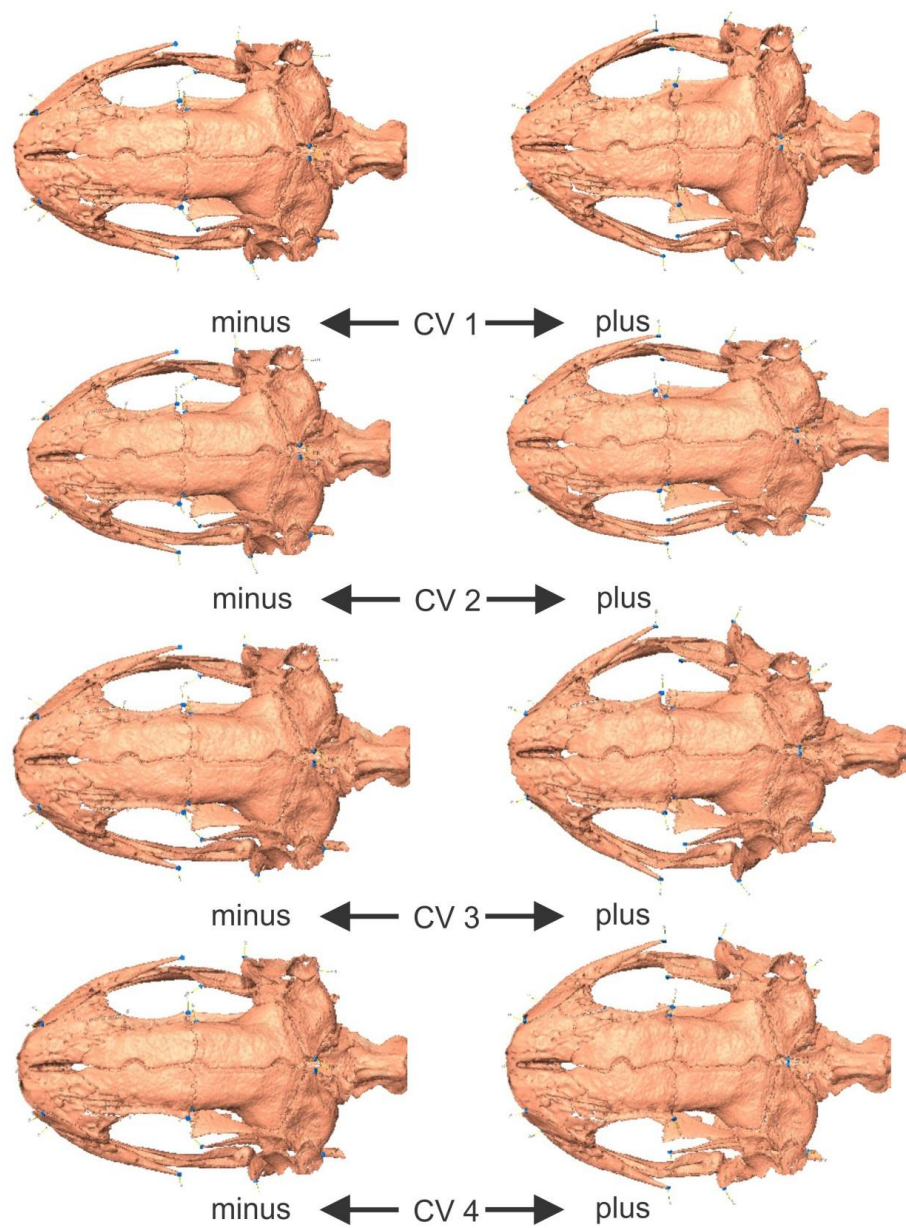
Poređenjem Prokrastovih distanci i Mahalanobisovih distanci utvrđeno je da se i vrste i njihovi hibridi međusobno statistički značajno razlikuju. Najveća razlika u srednjem obliku lobanje je u poređenju *T. cristatus* sa *T. marmoratus* (Tabela 16).



Slika 28. Položaj jedinki u morfološkom prostoru opisanom CV osama.



Slika 29. Prikaz promena oblika glavenog skeleta duž CV osa. Svetlija plava linija predstavlja srednji oblik glavenog skeleta, dok tamnija plava linija predstavlja oblik koji odgovara jedinkama sa maksimalnim negativnim, odnosno pozitivnim skorovima duž CV osa.

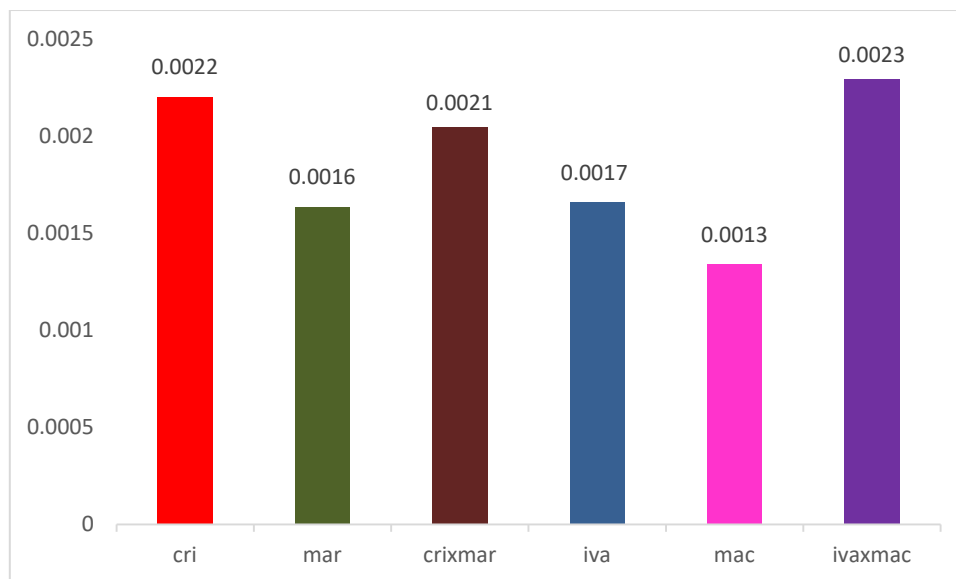


Slika 30. Prikaz promena oblika glavenog skeleta jedinki sa maksimalnim negativnim i pozitivnim skorovima na CV osama na trodimenzionalnim modelima lobanje.

Tabela 16. Vrednosti Prokrastovih (iznad dijagonale) i Mahalanobisovih distanci (ispod dijagonale). Permutacionim testovima sa 1000 ponavljanja uz Bonferonijevu korekciju utvrđena je statistička značajnost svih distanci ( $P < 0,0001$ ).

	<i>T. cri</i>	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	<i>T. iva</i>	<i>T. mac</i>	<i>T. mar</i>	<i>T. iva</i> × <i>T. mac</i>
<i>T. cristatus</i>		0,0647	0,0595	0,0587	0,0958	0,0596
<i>T. cristatus</i> × <i>T. marmoratus</i>	8,6452		0,0469	0,0455	0,0727	0,0617
<i>T. ivanbureschi</i>	7,6603	6,1142		0,0393	0,054	0,0402
<i>T. macedonicus</i>	7,2472	7,7024	6,0122		0,0663	0,0517
<i>T. marmoratus</i>	11,6082	7,1554	7,1711	9,5911		0,0679
<i>T. ivanbureschi</i> × <i>T. macedonicus</i>	6,8029	7,4263	4,9544	6,3132	9,0795	

Najvećom varijansom odlikuju se *T. ivanbureschi* × *T. macedonicus* hibrid i *T. cristatus*, dok je najmanji nivo unutargrupne varijabilnosti utvrđen kod *T. macedonicus* (Slika 31).



Slika 31. Nivo unutargrupne varijabilnosti (varijanse) ispitivanih grupa. Skraćenice: cri – *T. cristatus*, mar – *T. marmoratus*, cri×mar – *T. cristatus* × *T. marmoratus*, iva – *T. ivanbureschi*, mac – *T. macedonicus*, iva×mac – *T. ivanbureschi* × *T. macedonicus*.

#### 4.3.2 Procena fluktuirajuće asimetrije

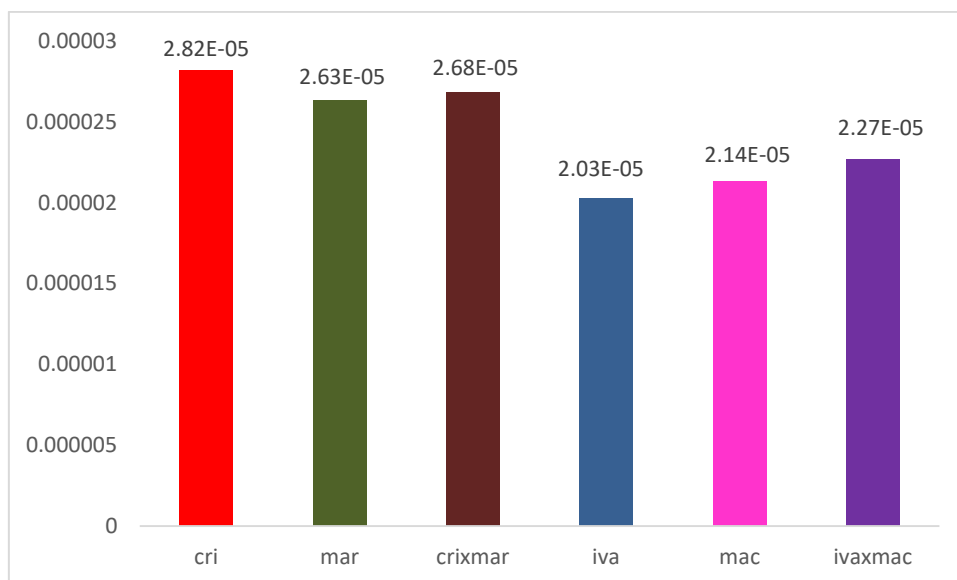
Prokrastova ANOVA pokazala je da je greška merenja zanemarljiva (srednja vrednost sume kvadrata greške merenja bila je oko 8 puta manja od srednje vrednosti sume kvadrata interakcije jedinka × strana), odnosno greška merenja nema uticaja na procenu asimetrije, pre svega FA.

Rezultati Prokrastove analize varijanse (ANOVA) za oblik glavenog skeleta ukazuju da na varijabilnost utiču razlike među jedinkama kod svih grupa, kao i interakcija jedinke i strane, odnosno kod svih grupa je utvrđena statistički značajna fluktuirajuća asimetrija. Direkciona simetrija, odnosno faktor strane, ima značajan uticaj na varijabilnost glavenog skeleta samo kod *T. cristatus* (Tabela 17).

Tabela 17. Rezultati Prokrastove analize varijanse (ANOVA) za oblik glavenog skeleta. Skraćenice: Ind – međuindividualna varijabilnost, DA – direkciona asimetrija, FA – fluktuirajuća asimetrija, MS – srednja vrednost sume kvadratnih odstupanja, df – stepeni slobode, *F* – vrednost F testa, *P*– nivo statističke značajnosti.

	Jedinka (Ind)				Strana (DA)				Jedinka × strana (FA)				Greška merenja	
	MS	df	F	<i>P</i>	MS	df	F	<i>P</i>	MS	df	F	<i>P</i>	MS	df
<i>T. cristatus</i>	0,000417	504	6,50	0,0001	0,000106	15	1,66	0,006	0,000064	540	8,16	0,0001	0,000008	1073
<i>T. marmoratus</i>	0,000284	574	4,97	0,0001	0,000084	15	1,47	0,110	0,000057	615	12,86	0,0001	0,000004	1219
<i>T. cris</i> × <i>T. mar</i>	0,000299	616	4,62	0,0001	0,000061	15	0,95	0,509	0,000065	660	5,89	0,0001	0,000011	1305
<i>T. ivanbureschi</i>	0,000473	280	10,73	0,0001	0,000056	15	1,27	0,222	0,000044	300	12,34	0,0001	0,000004	609
<i>T. macedonicus</i>	0,000232	252	5,02	0,0001	0,000050	15	1,08	0,378	0,000046	270	13,18	0,0001	0,000003	551
<i>T. iva</i> × <i>T. mac</i>	0,000325	364	6,41	0,0001	0,000043	15	0,84	0,639	0,000051	390	9,67	0,0001	0,000005	783

Najveće vrednosti FA10 indeksa ima *T. cristatus*, dok je vrednost najniža kod *T. ivanbureschi* (Slika 32).



Slika 32. Nivo fluktuirajuće asimetrije izražen preko FA10 indeksa. Skraćenice: cri – *T. cristatus*, mar – *T. marmoratus*, cri×mar – *T. cristatus* × *T. marmoratus*, iva – *T. ivanbureschi*, mac – *T. macedonicus*, iva×mac – *T. ivanbureschi* × *T. macedonicus*.

Statistički značajne razlike u nivou FA nisu utvrđene poređenjem roditeljskih vrsta i hibrida ni Levenovim ni *F* testom ( $P > 0,05$  u oba testa u svim poređenjima, Tabela 18).

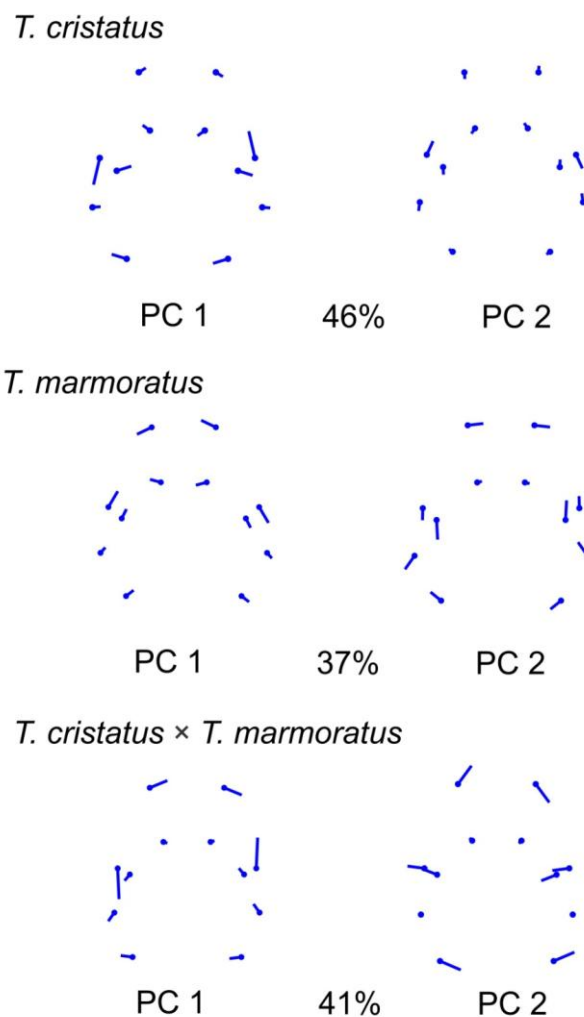
Tabela 18. Poređenje nivoa fluktuirajuće asimetrija (FA) roditeljskih vrsta i hibrida, kao i hibrida međusobno. Primenom oba testa nije utvrđena statistička značajnost u nivou FA ( $P > 0,05$  u svim poređenjima).

Poređene grupe	Levenov test <i>F</i>	<i>F</i> test <i>F</i>
<i>T. cri</i> – <i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	0,2946	1,0503
<i>T. mar</i> – <i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	0,0282	1,0197
<i>T. iva</i> × <i>T. mac</i> – <i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	0,5751	1,1813
<i>T. iva</i> – <i>T. iva</i> × <i>T. mac</i>	0,0300	1,1200
<i>T. mac</i> – <i>T. iva</i> × <i>T. mac</i>	0,1388	1,0641

Iako se vrste ne razlikuju u nivou FA, Prokrastova analiza varijanse je pokazala da postoji statistički značajna FA, kao i da se obrasci promene oblika na asimetričnoj komponenti

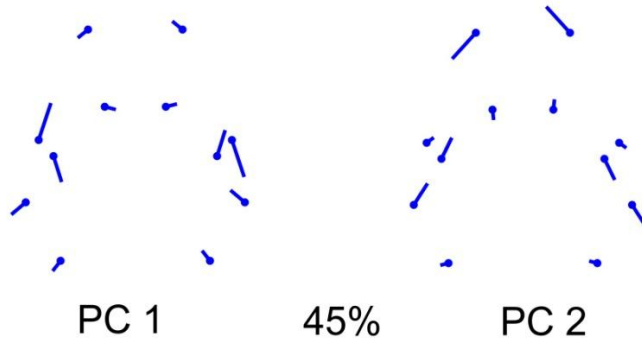


značajno razlikuju između vrsta. Prikazi obrazaca varijabilnosti asimetrije dobijeni su PCA analizom asimetrične komponente za svaku grupu ponaosob. Prve dve glavne komponente opisuju približno jednak procenat varijabilnosti, pa su obrasci promene oblika zaključeni na osnovu promena oblika na obe glavne komponente. Asimetrija je najizraženija kod struktura koje imaju funkciju u ishrani, dok specifične tačke na orbitosfenoideumima kao i specifične tačke na otičko-okcipitalnom region pokazuju manji stepen varijacija (Slike 33 i 34).

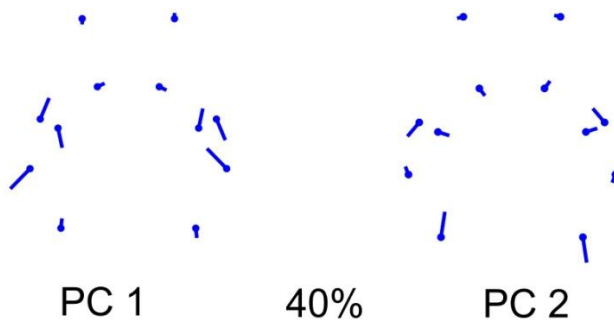


Slika 33. Obrasci promene oblika opisani prvom i drugom PC osom kod *T. cristatus*, *T. marmoratus* i njihovog hibrida. Dati procenti predstavljavaju proporciju varijanse asimetrične komponente opisane prvom i drugom glavnom komponentom. Plavi kružići predstavljaju konfiguraciju specifičnih tačaka, a linije pravac i intezitet promena oblika.

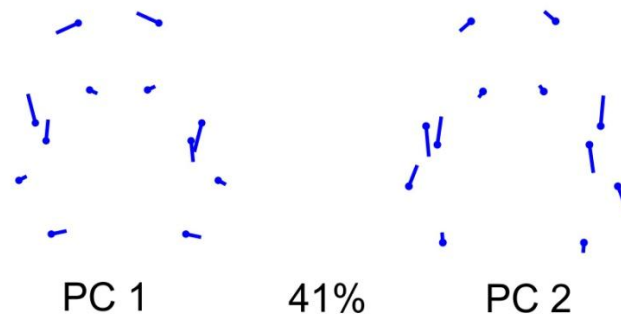
*T. ivanbureschi*



*T. macedonicus*



*T. ivanbureschi* × *T. macedonicus*



Slika 34. Obrasci promene oblika opisani na prvom i drugom PC osom kod *T. ivanbureschi*, *T. macedonicus* i njihovog hibrida. Dati procenti predstavljavaju proporciju varijanse asimetrične komponente opisane prvom i drugom glavnom komponentom. Plavi kružići predstavljaju konfiguraciju specifičnih tačaka a linije pravac i intezitet promena oblika.

## 5 Diskusija

---

Okvir za ovu doktorsku disertaciju, njene osnovne ciljeve kao i za hipoteze koje se odnose na neke od bazičnih postavki evolucione biologije razvića, dat je na osnovu sledećeg scenarija. Dve relativno blisko srodne vrste dolaze u ponovni kontakt nakon dugog perioda nezavisne evolucije. Usled međusobne reprodukcije formira se hibridna zona. Tokom vremena hibridna zona se pomera i ostavlja istorijski trag – široku zonu introgresije sa mitohondrijskom DNK jedne vrste i jedarnom DNK druge. Faktički, jedna vrsta hibridizujući sa drugom širi areal na račun te druge vrste, na čijem se pređašnjem arealu izdvaja izolovana enklava. Ovakav, po mnogo čemu jedinstven scenario sreće se na Balkanskom poluostrvu, na teritoriji Srbije, gde dve vrste repatih vodozemaca, Burešov dugonogi mrmoljak (*Triturus ivanbureschi*) i glavati veliki mrmoljak (*T. macedonicus*) dolaze u kontakt. Postavlja se pitanje koji su to mehanizmi i procesi koji su omogućili formiranje, pomeranje i održavanje hibridne zone. Da bi se došlo do odgovora na ova pitanja, bilo je neophodno vratiti se na početak, prvi kontakt između dve vrste i prvu generaciju njihovih hibrida. Sagledavanje reproduktivnog potencijala roditeljskih vrsta, potencijalnih reproduktivnih barijera, odlika rane životne istorije, morfološke varijabilnosti larvi i aduleta i puteva razvića, kao i uticaja hibridizacije na date osobine, jedni su od prvih koraka ka temeljnom objašnjenju datog scenarija. Takođe, ispitivanje morfološke varijabilnosti u prirodnim populacijama i poređenje stabilnosti razvića hibrida iz dve različite hibridne zone (u jednoj zoni hibridi su vijabilni, odnosno produkuju dalje generacije hibrida sa potencijalom hibridne specijacije, dok su u drugoj hibridi faktički sterilni i predstavljaju „slepu“ evolucionu liniju) pružaju uvid u nivo genomske stresa koji se ispoljava na fenotipskom nivou pod uticajem hibridizacije.

### 5.1 Reproductivni potencijal roditeljskih vrsta

Reproduktivni potencijal (broj produkovanih gameta) i stope preživljavanja su glavne odrednice biološkog potencijala vrste. Kod vrsta koje su u kompeticiji, razlike u reproduktivnom potencijalu mogu da imaju značajan uticaj na krajnji ishod, dajući prednost vrstama sa višim potencijalom, odnosno većim brojem produkovanih gameta.

Poznato je da je broj položenih jaja kod vodozemaca visoko varijabilan i može biti različit i među ženka ista populacije (Kaplan i Salthe 1979; Kalezić i sar. 1994; Rafińska 1991). Maksimalan broj jaja koje ženke mrmoljaka mogu da polože tokom jedne reproduktivne sezone predstavljen je brojem formiranih oocita u oviduktu na početku sezone. Međutim, deo jaja ne mora biti položen (Bell 1977; Verrell and Francillon 1986; Arntzen and Hedlund 1990).

Maksimalan broj položenih jaja, zabeležen u eksperimentima u okviru ove teze, koje je položila jedna *T. macedonicus* ženka (759), kao i *T. ivanbureschi* ženka (663, Tabela 5), premašuje prethodne procene maksimalnog broja položenih jaja za različite vrste velikih mrmoljaka (od 189 do 489; Arntzen i Teunis 1993; Cogălniceanu i sar. 2013). Dobijeni rezultat ukazuje da je reproduktivni potencijal velikih mrmoljaka daleko veći nego što se ranije pretpostavljalo. Zabeležena sezonska varijabilnost u broju položenih jaja potvrđuje značajan uticaj sredinskih faktora na ostvarenje reproduktivnog potencijala datih vrsta.

Na samu procenu ostvarenog reproduktivnog potencijala znatno utiče i odabrani metod prikupljanja podataka. U studiji Furtule i saradnika (2008), gravidne ženke su prikupljene iz prirodnih staništa i prenete u laboratoriju radi polaganja jaja. Vrlo je verovatno da je deo jaja prethodno već položen u prirodi, što bi moglo da objasni drastične razlike u broju položenih jaja pri proceni ostvarenog reproduktivnog potencijala. Slične razlike u broju položenih jaja pokazane su u poređenju dve studije u kojoj su gravidne *T. dobrogicus* ženke donete iz prirode da polažu jaja u laboratoriji (Furtula i sar. 2008) i u kojoj su adultne jedinke ukrštane u samoj laboratoriji (Cogălniceanu i sar. 2013).

### **5.1.1 Interspecijske razlike u broju i veličini jaja**

Iako su se vrste razlikovale u prosečnom broju položenih jaja samo u jednoj od tri analizirane sezone, *T. macedonicus* ima veći broj ukupno položenih jaja, odnosno ženke ove vrste se odlikuju višim reproduktivnim učinkom.

Imajući u vidu pređašnju i današnju distribuciju vrsta, očekivano je da se *T. macedonicus* odlikuje većim reproduktivnom potencijalom. Uopšteno, dobijeni rezultati potvrđuju ovu pretpostavku. Međutim, relativno mali broj ženki, velika intraspecijska

varijabilnost u broju položenih jaja (Tabela 5) i varijabilnost među sezonama, u velikoj meri utiču na procenu statističke značajnosti interspecijskih razlika. Posmatrajući razliku u broju jaja među vrstama tokom sve tri uzastopne sezone, uočava se da ne postoji doslednost i određeni obrazac interspecijske varijabilnosti.

Zanimljivo je napomenuti da zapremina vitelusa, koja odražava materinsko ulaganje (Duellman i Trueb 1986), kao i zapremina galerte, značajno variraju unutar vrste (između ženki i među sezonama). Poznato je da na veličinu jaja utiču različiti unutrašnji (npr. starost jedinke), kao i spoljašni faktori kako biotički (npr. prisustvo predatora), tako i abiotički (npr. temperatura) faktori (Griffiths i de Wijer 1994; Kurdíková i sar. 2011; Smith i sar. 2015b; Tóth 2015). Upravo ovako širok spektar različitih uticaja, objašnjava i dobijenu varijabilnost. *Triturus macedonicus* se odlikuje značajno većim jajima (vitelusom i galertom) u odnosu na *T. ivanbureschi*. Veća galerta utiče na bolju zaštitu jaja i embriona od različitih štetnih uticaja iz spoljašnje sredine (npr. UV zračenja), mehaničkih povreda i različitih gljivičnih infekcija (Duellman i Trueb 1986; Adams i sar. 2001; Palen i sar. 2005). S obzirom da galerta ima mnoge, različite funkcije, njena veličina se može smatrati adaptivnom osobinom, tako da bi veća galerta mogla biti prednost koja utiče na stope preživljavanja jaja i embriona.

### **5.1.2 Dodatni faktori koji bi mogli da objasne varijabilnost reproduktivnog potencijala**

Vreme prilagođavanja na nove uslove, sama postavka eksperimenta i eksperimentalni uslovi (koji iako simuliraju prirodne uslove ne odgovaraju u potpunosti optimalnim rasponima sredinskih uslova za date vrste), kao i izloženost potencijalno nepoželjnim mužjacima, mogu da imaju značajan uticaj na reproduktivni ishod. Poznato je da ženke vodozemaca zadržavaju ili reapsorbuju deo oocita i oviduktalnih jaja ukoliko uslovi za oplođenje i/ili ovipoziciju nisu optimalni. Polaganje jaja može biti ograničeno različitim spoljašnjim faktorima (npr. stalnost vodenih basena, uklanjanje podvodne vegetacije na mestima ovipozicije) (Cogălniceanu i sar. 2013; Kurdíková i sar. 2011; Dvořák i Gvoždík 2009). Takođe, kod žaba je pokazano da amplexus sa neželjenim mužjacima može da dovede do smanjenja veličine legla (Reyer i sar. 1999).

U eksperimentima u okviru ove disertacije, ukrštane su jedinke dve vrste koje su donete iz prirodnih populacija sa različitim geografskim i klimatskim karakteristikama. Eksperimentalna ukrštanja su se izvodila pod istim spoljašnjim uslovima izvan granica areala obe vrste. Ukrštanja su se razlikovala među sezonama, odnosno ista jedinka je učestvovala u različitim tipovima ukrštanja. U zavisnosti od sezone, istim ženka je bilo omogućeno da se ukrštaju sa mužjacima iste ili druge vrste, pri čemu su mužjaci bili iz dve uzrasne klase: mlađi (dve do tri godine) ili stariji mužjaci (pet i više godina). Pre prvog eksperimenta 2016. godine, *T. ivanbureschi* jedinke su već bile aklimatizovane na eksperimentalne uslove, odnosno dva puta su hibernirale u laboratoriji i bile ukrštane u prethodnom eksperimentu, dok su jedinke *T. macedonicus* uvedene u eksperiment nakon prve hibernacije u laboratoriji. Opisana razlika u vremenu prilagođavanja na nove uslove je još jedan od faktora koji je mogao da utiče na dobijene rezultate.

### **5.1.3 Dinamika ovipozicije**

Ženke *T. ivanbureschi* započinjale su polaganje jaja ranije nego ženke *T. macedonicus* u sve tri sezone (ponovljena ukrštanja). Tokom celokupnog eksperimenta obe vrste su gajene u istim uslovima (npr. ista temperatura, voda, hrana) tako da se zabeležena razlika u početku polaganja može objasniti temperaturom u spoljašnjoj sredini. Ranije je pokazano da temperaturne promene mogu da imaju specifičan uticaj na reprodukciju vodozemaca zavisno od vrste (Mettouris i sar. 2017). Pošto *T. macedonicus* ima južnije rasprostranjenje i termofilniji je nego *T. ivanbureschi* (Litvinchuck i sar. 2007), očekivano je da je viša spoljašnja temperatura okidač koji pokreće reprodukciju i ovipoziciju ove vrste. U svakom slučaju, razlike među vrstama u dinamici ovipozicije (npr. početak ovipozicije, faza sa najviše položenih jaja) najbližnje su među sezonama u odnosu na ostale ispitivane reproduktivne karakteristike.

### **5.1.4 Reproductivni potencijal i scenario zamene vrsta**

Razlike u reproduktivnom potencijalu mogu biti veoma važne u objašnjavanju scenarija zamena vrsta, ali to ne mora biti pravilo. Na primer, u zapadnoj Fancuskoj

*T. cristatus* širi areal na račun *T. marmoratus*. Međutim, *T. marmoratus* ženke imaju znatno veći broj položenih jaja tokom jedne sezone kao i tokom celokupnog života jedinki. Dakle, u slučaju *T. cristatus* i *T. marmoratus* reproduktivni potencijal ženki ne može da objasni dati scenario. Arncen i Hedlund (Arntzen i Hedlund 1990) su prepostavili da antropogene promene terestričnih staništa omogućavaju širenje *T. cristatus*.

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji pokazuju da se *T. macedonicus* ženke uglavnom odlikuju boljim reproduktivnim performansama (veći prosečan broj i /ili veličina položenih jaja) i različitom dinamikom polaganja jaja u odnosu na *T. ivanbureschi*. Uzimajući u obzir prethodnu studiju koja je pokazala da su stope preživljavanja takođe više kod *T. macedonicus* (Cvijanović i sar. 2009), može da se zaključi da su ispitivane reproduktivne karakteristike mogle, barem inicijalno, doprineti širenju *T. macedonicus* na račun vrste *T. ivanbureschi*. S obzirom na razlike u dinamici polaganja i na termofilnost *T. macedonicus*, promene temperature i globalno zagrevanje mogli bi značajno da doprinesu širenju rasprostranjenja date vrste u budućnosti. Međutim, da bi se omogućilo detaljnije ispitivanje i kompletnije objašnjenje datog scenarija u smislu reproduktivnih razlika, neophodno je ispitati reproduktivne karakteristike recipročnih F<sub>1</sub> hibrida i stope preživljavanja F<sub>2</sub> generacije dobijene međusobnim ukrštanjem hibrida, kao i njihovim povratnim ukrštanjem sa roditeljskim vrstama.

## 5.2 Uticaj hibridizacije na odlike rane životne istorije

Hibridizacija može, s jedne strane, dovesti do stabilnih evolucionih promena životnih istorija i hibridne specijacije, ili do smanjenja adaptivnih vrednosti hibrida i izumiranja, s druge strane. Veliki mrmoljci su dobar model sistem za ispitivanje različitih ishoda hibridizacije budući da do hibridizacije dolazi među vrstama sa različitim stepenom genetičke diferencijacije i samim tim ishodi mogu biti raznovrsni.

U prirodnoj populaciji *T. ivanbureschi* × *T. macedonicus*, sve hibridne jedinke F<sub>n</sub> generacije imaju *T. ivanbureschi* mitohondrijsku DNK (Wielstra i Arntzen 2014; Wielstra i sar. 2014c; Arntzen i sar. 2018). Sama činjenica da je populacija stabilna i vijabilna, ukazuje da hibridizacija ne dovodi do drastičnih promena životne istorije. S druge strane, hibridna

populacija *T. cristatus* × *T. marmoratus*, sastavljena je pretežno iz F<sub>1</sub> generacije i to sa izraženom asimetrijom gde je čak 90% adultnih jedinki sa *T. cristatus* mtDNK. Međutim, embrioni i larve oba hibrida su prisutni u sličnim učestalostima, tako da je zaključeno da diferencijalna selekcija deluje nakon metamorfoze, tokom juvenilnog i subadultnog perioda razvića (Arntzen i sar. 2009).

S obzirom na specifični scenario zamene vrsta i asimetričnu introgresiju mitohondrijske DNK, očekivano je da na nekom nivou interspecijskog ukrštanja *T. ivanbureschi* i *T. macedonicus* postoje izolacioni mehanizmi kojim se isključuje mtDNK *T. macedonicus*. U unakrsnim ukrštanjima *T. macedonicus* i *T. ivanbureschi* dobijena je vijabilna F<sub>1</sub> generacija, što ukazuje da do asimetrije dolazi dejstvom selekcije na stupnjeve nakon izaljivanja larvi ili kod kasnijih hibridnih generacija nastalih međusobnim ili povratnim ukrštanjem sa roditeljskim vrstama.

Rezultati dobijeni u ovom radu ispitivanjem vijabilnosti jaja, embriona, kao i stope izvaljivanja larvi čistih vrsta i recipročnih F<sub>1</sub> hibrida, ukazuju na nekoliko fenomena. Već u prvoj generaciji hibrida dobijenoj u laboratorijskim uslovima, zabeležena je razlika u preživljavanju jaja i embriona između dve recipročne grupe hibrida, ali ne i u stopi izvaljivanja larvi. U F<sub>1</sub> hibridnoj generaciji, udeo jaja koje se ne razvijaju značajno je veći u ukrštanju gde su majke *T. ivanbureschi*. Samim tim dolazi i do razlike u udelu embriona koji ne dovršavaju razviće. Takođe, obe roditeljske vrste razlikuju se samo od hibrida *T. ivanbureschi* majki po udelu embriona koji ne završavaju razviće. Ipak, kada se posmatra procenat embriona koji su stali sa razvićem i izvaljenih larvi u odnosu na broj vijabilnih jaja, ove razlike se gube. Dakle, hibridizacija utiče na rano razviće smanjujući vijabilitet jaja i to kod obe grupe recipročnih hibrida, s tim što je uticaj izraženiji kod hibridnih jaja *T. ivanbureschi* majki.

Kako se u prirodnoj hibridnoj populaciji nalaze samo hibridi sa *T. ivanbureschi* mtDNK (Arntzen i sar. 2018), moglo bi da se pretpostavi da promene rane životne istorije mogu predstavljati postzigotsku barijeru pri ukrštanju *T. macedonicus* ženki sa mužjacima druge vrste. Međutim, dobijeni rezultati su u suprotnosti sa datom pretpostavkom, te ostaje otvoreno pitanje kada i na koji način dolazi do isključivanja *T. macedonicus* mtDNK. Dalja međusobna ukrštanja F<sub>1</sub> hibrida iste ili različite grupe (*T. ivanbureschi* majki i *T. macedonicus*



majki), kao i povratno ukrštanje obe grupe hibrida sa roditeljskim vrstama, mogla bi da ukažu da li uopšte postoje, i ako postoje, kada i na kom nivou deluju izolacioni mehanizmi. Sama introgresija mtDNK je česta pojava u životinjskom svetu (Toews i Brelsford 2012). Introgresija mtDNK se može objasniti adaptivnošću introgresije mtDNK ili demografskim razlikama, kao što su na primer, razlika u disperziji polova ili izražena asimetrija u brojnosti mužjaka i ženki. Jedno od ponuđenih objašnjenja je i pomeranje hibridne zone. Međutim, praktično nema empirijskih studija koje testiraju navedene hipoteze.

Iako hibridizacija direktno ne utiče na stopu izvaljivanja larvi, smanjen vijabilitet jaja dovodi do ukupnog manjeg broja hibridnih larvi. U prirodnim populacijama hibridne zone mrmoljaka su uske (Arntzen i sar. 2014). Moguće je da je upravo uticaj hibridizacije na smanjenje vijabilnosti jaja jedan od mehanizama koji ne dozvoljava širenje hibridnih zona.

### **5.3 Uticaj hibridizacije na morfološku varijabilnost larvi velikih mrmoljaka**

#### **5.3.1 Promene u veličini i spoljašnjoj morfologiji repa**

Rezultati analiza morfološke varijabilnosti repa larvi *T. ivanbureschi*, *T. macedonicus* i njihovih recipročnih F<sub>1</sub> hibrida, ukazuju da je morfološka diferencijacija prisutna na larvenim stupnjevima. Dve srodne vrste razlikuju se po obliku repa. Značajne razlike među dve vrste pronađene su i za visinu mišića repa, kao i obrasce obojenosti. F<sub>1</sub> hibridi razlikuju se od roditeljskih vrsta po veličini i obliku repa i karakterišu se obojenim filamentom na vrhu repa. Razlike između dve grupe recipročnih hibrida (*T. ivanbureschi* majki i *T. macedonicus* majki) nisu ustanovljene.

##### **5.3.1.1 Divergencija roditeljskih vrsta**

Postoji čitav niz dokumentovanih morfoloških razlika adultnih *T. ivanbureschi* i *T. macedonicus* (npr. Arntzen 2003; Vukov i sar. 2011). Rezultati dobijeni u ovom radu potvrdili su da postoje razlike između ovih vrsta i na stupnju larvi. U odnosu na *T. macedonicus*, larve *T. ivanbureschi* odlikuju se užim repom sa izraženom muskulaturom.

Ustanovljene su i razlike u obojenosti repa – drugačiji raspored i položaj mramoraste obojenosti i prisustvo odnosno odsustvo tamnih mrlja na sredini repa. Rep larvi *T. ivanbureschi* se odlikuje mramorastom obojenošću iznad i ispod lateralne linije i tamnim mrljama na središnjem, mišičnom delu repa, dok je kod *T. macedonicus* mramorasta obojenost uniformno raspoređena po celoj površini repa, bez mrlja na središnjem delu.

### **5.3.1.2 Divergencija roditeljskih vrsta i $F_1$ hibrida**

Prethodne studije hibrida velikih mrmoljaka pokazale su da hibridi imaju intermedijarne morfološke karaktere u odnosu na roditeljske vrste u ukrštanjima *T. cristatus* × *T. marmoratus* (npr. Francillon-Vieillot i sar. 1990; Arntzen i Wallis 1994; Slijepčević i sar. 2015), *T. cristatus* × *T. carnifex* (Brede i sar. 2000), *T. carnifex* × *T. dobrogicus* (Vinšálková i Gvoždík 2007), *T. carnifex* × *T. karelinii* (Litvinchuk i Borkin 2009) i *T. dobrogicus* × *T. karelinii* (Litvinchuk i Borkin 2009). Rezultati dobijeni u ovom radu potvrdili su intermedijarne vrednosti oba hibrida u odnosu na roditeljske vrste za visinu mišića repa. Međutim, hibridi su imali relativno duži rep u poređenju sa roditeljskim vrstama.

Recipročni  $F_1$  hibridi su veoma slični međusobno bez značajnih razlika u veličini, obliku i obojenosti repa. Najizraženija razlika između oba  $F_1$  hibrida i roditeljskih vrsta je dugačak filament na vrhu repa. Izduženi rep, sa dugačkim filamentom, može da utiče na povišenu stopu preživljavanja u prirodi, odvlačeći predatora od glave i tela i time smanjujući povrede sa smrtonosnim ishodom (Van Buskirk i sar. 2003). S obzirom na izrazitu plastičnost u veličini, obliku i obojenosti larvi vodozemaca u prirodnim populacijama (npr. Van Buskirk 2009, 2011) neophodno je istražiti koliko je repni filament prisutan u prirodnim populacijama van i u okviru hibridne zone da bi se doneo zaključak o mogućoj adaptivnoj prednosti ove osobine.

### **5.3.1.3 Morfologija repa i moguće funkcionalne razlike**

Važnost varijabilnosti u veličini i obliku repa u odnosu na funkciju opsežno je proučavana kod različitih larvi vodozemaca (Webb 1984; Wassersug i Hoff 1985; Wassersug 1989; Weihs 1989; Liu i sar. 1996). Proučavanja varijabilnosti morfologije repa uglavnom su se ticala uticaja na performansu plivanja, kao i odgovora na prisustvo predatora. Brzina

plivanja značajno je korelisana sa dužinom repa (Ackerly i Ward 2015), ali ne i sa visinom repa (Van Buskirk i McCollum 2000). Maksimalna visina repa je važna za efikasno izbegavanje predatora (Van Buskirk i sar. 1997; Van Buskirk i Schmidt 2000).

Razlike u veličini repa nisu utvrđene kod *T. ivanbureschi* i *T. macedonicus* larvi, mada postoji razlika u obliku repa. Kao što je već navedeno, postoji izrazita plastičnost u obliku repa u prirodnim populacijama. *Triturus ivanbureschi* i *T. macedonicus* se reprodukuju u sličnim akvatičnim staništima i izloženi su izuzetno varijabilnim uslovima spoljašnje sredine u samim staništima (Džukić i sar. 2016). U ovom istraživanju, poređene su larve odgajane u istim, kontrolisanim laboratorijskim uslovima, tako da je dobijena razlika u obliku repa verovatno genetički determinisana, odnosno predstavlja rezultat relativno duge nezavisne evolucije dve vrste.

Mnoge životinje, uključujući vodozemce, imaju homoplastični oblik tela larvi u poređenju sa adultnim jedinkama (Smith i sar. 1995; Wiens i sar. 2005). Dobijeni rezultati, zajedno sa prethodno utvrđenom morfološkom divergencijom oblika tela larvi kod velikih mrmoljaka (Ivanović i sar. 2011), ukazuju da morfološki disparitet karakteriše larvene stupnjeve velikih mrmoljaka, što je i potvrđeno istraživanjem promena nivoa dispariteta tokom ontogenije oblika glave.

### **5.3.2 *Ontogenija oblika glave velikih mrmoljaka i njihovih hibrida sa posebnim osvrtom na metamorfozu i složeni životni ciklus kao ontogenetsko ograničenje***

Metamorfoza je izuzetno važan period u razviću vodozemaca u kome dolazi do rapidnih morfoloških i fizioloških transformacija. Zbog opšte integracije morfogenetskih procesa pri prelasku akvatičnog, larvenog u terestrični juvenilni fenotip, očekivano je da morfologija na juvenilnom stupnju odmah nakon metamorfoze bude konzervativnija u odnosu na prethodne larvene stupnjeve. Međutim, rezultati dobijeni u okviru ovog rada ukazuju da se divergencija među roditeljskim vrstama, kao i među vrstama i hibridima, javlja u ranom razviću i da se produbljuje tokom ontogenije. Vrste i hibridi razlikuju se u svim ispitivanim parametrima – hronološkoj starosti, veličini i obliku glave, kao i ontogenetskim trajektorijama

oblika glave. Suprotno od polazne pretpostavke, na stupnju po završetku metamorfoze, dve vrste i njihovi recipročni hibridi nisu međusobno sličniji nego na larvenim stupnjevima.

### **5.3.2.1 *Razlike u hronološkoj brzini razvića roditeljskih vrsta i hibrida***

Utvrđeno je da je period izvaljivanja konzervativan, odnosno da se larve obe vrste i njihovih hibrida izvaljuju iz galerte u približno istom periodu razvića (okvirno 16. dana od polaganja jaja). Izvaljene jedinke su na istom ontogenetskom stupnju (formirana prva dva prsta na prednjim ekstremitetima). Dakle, pri izvaljivanju larvi ne postoje značajne razlike između vrsta i hibrida ni u hronološkoj starosti niti u stupnju razvića. Do diferencije u starosti larvi dolazi nakon stupnja koji se karakteriše početkom formiranja zadnjih ekstremiteta između 30. i 33. dana od ovipozicije. Ova razlika među ispitivanim grupama se potom zadržava tokom kasnijih faza sve do završetka metamorfoze. Sličnost među grupama u starosti i razvojnom stupnju pri izvaljivanju, ukazuje na visoku konzervativnost trajanja embrionskog razvića što je i očekivano za vrste koje su se ne tako davno odvojile od zajedničkog pretka. Embrionsko razviće srodnih vrsta može biti spregnuto sličnim razvojnim, odnosno ontogenetskim ograničenjima (fizičkim, morfogenetskim i filogenetskim; pogledati Gilbert 2010) nasleđenim od zajedničkog pretka, koja zajedno sa kanalisanošću deluju u pravcu smanjenja međugrupne varijabilnosti, tj. dispariteta. S druge strane, razlike u hronološkoj starosti nakon izvaljivanja, kada su larve u direktnom kontaktu sa spoljašnjom sredinom, mogu biti povezane sa selektivnim pritiscima, zahtevima spoljašnje sredine i investiranjem u rast i razviće, koji su specifični za svaku ispitivanu grupu.

### **5.3.2.2 *Razlike u veličini i obliku glave***

Za razliku od starosti larvi, razlike u veličini i obliku glave su primetne odmah po izvaljivanju. Na ovom stupnju usni otvor još uvek nije potpuno formiran što onemogućava ishranu (Duellman i Trueb 1986; Takahama i sar. 1988; Lebedkina 2004). U skladu sa tim, veličina i oblik glave su definisani unutrašnjim faktorima, a ne funkcionalnim ili mehaničkim sredinskim faktorima, kao što je na primer veličina plena. Takođe, u ranijim studijama je pokazano da morfološke razlike među vrstama žaba nisu posledica diferencijalnog rasta tokom

larvenih stupnjeva već da se javljaju rano tokom embrionskog razvića, ukazujući na različite obrasce embrionskog i larvenog rasta (Harris 1989; Strauss 1992; Strauss i Altig 1992).

Alometrijske promene oblika, odnosno promene oblika koje su vezane za veličinu, u velikoj meri utiču na promene oblika tokom ontogenije (npr. Klingenberg 2016). Empirijski je utvrđeno da alometrija ima značajan uticaj na promene oblika kranijuma velikih mrmoljaka nakon metamorfoze (Ivanović i sar. 2007). Kod žaba je takođe pokazano da alometrija ima veliki uticaj, kako na varijabilnost oblika glavenog skeleta kod larvi (Larson 2002, 2004, 2005), tako i nakon metamorfoze (Ponssa i Candiotti 2012; Vukov i sar. 2018). Rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju da obe analizirane vrste, kao i njihovi recipročni hibridi, imaju slične alometrijske promene oblika glave tokom ontogenije. Međutim, sa promenom veličine glave, javlja se i razlika između *T. ivanbureschi* i ostalih analiziranih grupa. Do divergencije dolazi tokom središnjeg larvenog perioda i zadržava se u istom pravcu i nakon metamorfoze. Dakle, metamorfoza ne utiče na alometrijske odnose ustanovljene tokom larvenih faza razvića.

Tokom ontogenije, ustanovljena su dva glavna obrasca pozicioniranja *T. ivanbureschi*, *T. macedonicus* i njihovih recipročnih hibrida u morfološkom prostoru. Na stupnju nakon izvaljivanja larvi, vrste i obe grupe hibrida se međusobno razlikuju. Tokom daljeg razvića dolazi do promene obrasca tako da su recipročni hibridi sličniji jednoj od roditeljskih vrsta. Na stupnju nakon metamorfoze obrazac je sličan onom nakon izvaljivanja, odnosno ponovno se javlja razlika u obliku među svim grupama. Po adaptivnoj hipotezi, po kojoj metamorfoza omogućava nezavisne adaptacije stupnjeva koji su izloženi različitim selektivnim pritiscima (Moran 1994), očekivani su različiti obrasci morfološkog dispartiteta kod larvi u odnosu na metamorfozirane jedinke. Empirijski je pokazano da na makroevolucionom nivou, larve i adultni stupnjevi velikog broja vrsta bezrepih vodozemaca imaju različite položaje u morfološkom prostoru (npr. Sheratt i sar. 2017; Valero i sar. 2017). Dobijena interspecijska sličnost u obrascima pozicioniranja u morfološkom prostoru, mogla bi da se objasni relativno skorim odvajanjem od zajedničkog pretka i sličnom evolucionom istorijom (Wielstra i sar. 2019), ali i generalno sličnom ekologijom vrsta i preferencama u odabiru staništa (Arntzen 2003; Džukić i sar. 2016; Wielstra i sar. 2019).

### 5.3.2.3 *Dinamika fenotipske varijanse tokom ontogenije*

Ranije je navedeno da bi smanjenje fenotipske varijanse trebalo da odražava kanalisnost razvića, odnosno tendenciju razvojnih procesa da prate određene trajektorije, ograniče i usmere fenotipsku varijabilnost (Waddington 1942, 1953, 1957; Wagner i sar. 1997; Zelditch i sar. 2012; Hallgrimsson i sar. 2019; Takahashi 2019; Klingenberg 2019). Dobijeni slični obrasci promene varijanse tokom ontogenije velikih mrmoljaka i njihovih hibrida, ukazuju da postoje vrlo slični mehanizmi kanalisnosti razvića, bez obzira na genetičku diferencijaciju dve vrste ili nove genetičke kombinacije dobijene njihovim ukrštanjem. Kod obe vrste i oba recipročna hibrida, najviša vrednost varijanse zabeležena je na stupnju nakon izvaljivanja larvi iz zaštitnog, galernog omotača. Svi analizirani larveni stupnjevi odlikuju se nižim vrednostima varijanse koje su međusobno slične. Međutim, na stupnju nakon metamorfoze vrednost varijanse ponovo raste do nivoa sličnog onom po izvaljivanju (Slika 25a). Dakle, na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je period rasta i razvića larvi znatno kanalisniji u odnosu na stupnjeve nakon izvaljivanja i metamorfoze. Zanimljivo je da se povećanje vrednosti varijanse podudara sa stupnjevima na kojima se organizmi suočavaju sa novom, drugačijom spoljašnjom sredinom. Naime, kako je ranije spomenuto, embrionsko razviće i formiranje larvi odvija se u zaštitnom omotaču. Razbijanjem omotača larve dolaze u direktan kontakt sa akvatičnom spoljašnjom sredinom. Isto tako, metamorfozirane, juvenilne jedinice izlaze na kopno i stupaju u novu, terestričnu sredinu. Najviša vrednost varijanse zabeležena na stupnju po izvaljivanju u skladu je sa pretpostavkom da je rana ontogenija fleksibilnija i manje funkcionalno ograničena od kasnijih stupnjeva (Zelditch i sar. 2003, 2012). Na primer, neka od funkcionalnih ograničenja razvića larvi velikih mrmoljaka u vezi su sa ishranom i razvićem usnog otvora, koji na ovom stupnju još nije formiran.

Očekivani povišen nivo kanalisnosti razvića tokom metamorfoze, koji bi se ogledao smanjenom varijansom na stupnju po završetku metamorfoze, nije uočen. Naprotiv, na datom stupnju varijansa je povišena. Ovakav obrazac mogao bi biti u skladu je sa adaptivnom hipotezom, jer povišena varijansa može biti povezana sa evolvabilnošću metamorfoze i rezultujućim fenotipom koji dolazi u susret sa novom sredinom.

#### **5.3.2.4 *Ontogenetska dinamika morfološkog dispariteta***

Bez obzira na moguće trendove dispariteta tokom larvenog razvića, bilo je očekivano da nivo dispariteta bude najniži na stupnju nakon metamorfoze. Ova pretpostavka je uglavnom zasnovana na prethodno dobijenim rezultatima ispitivanja ontogenetske dinamike promena oblika velikih mrmoljaka koji su pokazali da tek metamorfozirane juvenilne jedinke imaju nižu intra- i interspecijsku varijabilnost u obliku tela u odnosu na larve (Ivanović i sar. 2011) ili u obliku kranijuma u odnosu na adulte (Ivanović i sar. 2007). Međutim, detaljnija studija ontogenije oblika kranijuma ukazala je da nema razlike u disparitetu između tek metamorfoziranih juvenilnih jedinki i adulata (Cvijanović i sar. 2014). Razlika u obrascima dispariteta dobijenim u ove dve studije, može da se objasni neodgovarajućim uzorkom i odabirom vrsta u prvoj studiji (Ivanović i sar. 2007). Striktno definisani ontogenetski stupnjevi i ontogenetske serije četiri ispitivane grupe korišćene u istraživanju u okviru ove teze, omogućavaju pouzdanu procenu dispariteta u obliku glave. Dobijeni rezultati se nadovezuju na rezultate Cvijanovićeve i saradnika (2014) ukazujući da je tokom ontogenije (od izvaljivanja larvi, preko metamorfoze i juvenilnih, do adultnih stupnjeva) nivo dispariteta uglavnom konstantan. Jedini skok u nivou dispariteta uočen je na stupnju po završetku metamorfoze.

#### **5.3.2.5 *Metamorfoza i razvojna ograničenja***

Visok nivo varijanse i dispariteta u obliku glave na stupnju nakon metamorfoze (Cvijanović i sar. 2014; rezultati ovog rada) i kanalisani i veoma konzervativan oblik tela na istom stupnju (Ivanović i sar. 2011), mogu se objasniti prirodom same morfološke celine čija se ontogenija prati. Kao što je ranije navedeno, tokom metamorfoze neke morfološke celine prolaze kroz veće, čak drastične promene, dok druge ostaju relativno nepromenjene ili visoko integrisane (Bonett i Blair 2017; Bonett i sar. 2018). Upravo se oblik glave i tela mogu okarakterisati kao osobine koje prolaze kroz različitu „količinu promena“ tokom metamorfoze. Aksijalni skelet je definisan tokom ranog embrionskog razvića i nije podložan drastičnim promenama tokom metamorfoze (Slijepčević i sar. 2015; Govedarica i sar. 2017). Ekstremiteti su u potpunosti razvijeni na kasnim larvenim stupnjevima i takođe ne prolaze kroz značajne promene tokom metamorfoze. Međutim, pokazano je da suprostavljeni funkcionalni zahtevi

dve sredine dovode do razlika u obrascima korelacije skeletnih elemenata ekstremiteta kod larvi i tek metamorfoziranih juvenilnih jedinki (Tomašević Kolarov i sar. 2011). Dakle, postoji određeni balans (engl. *trade-off*) među suprostavljenim zahtevima različitih načina kretanja – plivanja i hodanja (Gvoždik i Van Damme 2006). Povećana evolvabilnost usled eliminacije jedne od faze (akvatične ili terestrične), i samim tim i gubitkom složenog životnog ciklusa i metamorfoze, utvrđena je za oblik tela repatih vodozemaca (Bonett i Blair 2017; Bonett i sar. 2018). Za razliku od aksijalnog skeleta i skeleta ekstremiteta, glavni skelet prolazi kroz drastične promene tokom metamorfoze, pri čemu dolazi do potpune promene i razdvajanja specijalizovanih struktura kod larvi i metamorfoziranih jedinki, što omogućava eksploataciju različitih životnih sredina.

Složenost razvojnih procesa, uključujući metamorfozu, može biti istovremeno izvor i ograničenje morfoloških promena (Alberch 1982; Hanken 1989; Moran 1994; Wake 2009). Visoka morfološka varijabilnost oblika glave na stupnju nakon metamorfoze među vrstama i hibridima, kao i unutar samih vrsta i njihovih hibrida, ukazuje da metamorfoza ne predstavlja razvojno ograničenje, barem to nije za oblik glave repatih vodozemaca. Međutim, da bi se testirao uticaj metamorfoze na morfološku varijabilnost i procenila ograničenja metamorfoze, neohodna su dalja istraživanja dodatnih osobina koje prolaze kroz različit nivo promena tokom metamorfoze i to na širem, makroevolucionom nivou.

#### **5.3.2.6 Rekonstrukcija ontogenetskih putanja**

Obe vrste velikih mrmoljaka kao i njihovi hibridi imaju međusobno jasno odvojene puteve razvića. Iako je opšti obrazac promena oblika glave naizgled sličan, utvrđene su značajne razlike u svim atributima ontogenetskih trajektorija: poziciji, veličini, pravcu i obliku. Po vrednostima ispitivanih atributa, trajektorije oba hibrida se uglavnom pozicioniraju između roditeljskih.

Momenat razdvajanja putanja nije uočen što ukazuje da do morfološke divergencije vrsta i njihovih hibrida dolazi pre izvaljivanja larvi iz zaštitne opne, tokom embrionskog razvića (videti Mitteroecker i sar. 2004). Ovakva rana divergencija, može biti posledica nezavisne evolucije dve vrste čiji se zajednički predak procenjuje u kasnom Miocenu (Ivanović i Arntzen 2014; Wielstra i sar. 2019). Da bi se utvrdilo u kom periodu dolazi do



morfološke divergencije među vrstama, kao i među vrstama i njihovim hibridima, neophodna je rekonstrukcija i poređenje trajektorija tokom ranijih faza, odnosno embrionskog razvića. Ovi rezultati ukazuju na problem „tradicionalnog formalizma“ (Alberch i sar. 1979) koji pretpostavlja da do morfoloških promena dolazi na kasnijim stupnjevima razvića (npr. Zelditch i sar. 2012). Odnosno, čak i kod filogenetski bliskih vrsta, koje se međusobno ukrštaju i daju vijabilno potomstvo, do razdvajanja ontogenetskih trajektorija dolazi tokom ranih faza embrionskog razvića.

## **5.4 Uticaj hibridizacije na morfološku varijabilnost adulata velikih mrmoljaka**

### **5.4.1 Oblik kranijalnog skeleta**

Oblik lobanje velikih mrmoljaka je specifičan za svaku vrstu i odražava filogenetske odnose u okviru roda (Ivanović i Arntzen 2014). Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji u skladu sa prethodnim nalazima (npr. Ivanović i sar. 2013; Ivanović i Arntzen 2014) i sve vrste se međusobno razlikuju po obliku glavenog skeleta. Najviše se izdvaja oblik glave *T. marmoratus* što je i očekivano s obzirom da se klada kojoj pripada najranije odvojila. U analiziranom uzorku, najveća razlika je utvrđena između *T. cristatus* i *T. marmoratus* dok su *T. ivanbureschi* i *T. macedonicus* međusobno najsličniji. Oblik lobanje oba ispitivana hibrida (*T. cristatus* × *T. marmoratus* i *T. ivanbureschi* × *T. macedonicus*) razlikuje se međusobno, kao i od obe roditeljske vrste. Dakle, hibridizacija rezultuje novim, drugačijim oblikom glavenog skeleta. Hibrid *T. cristatus* × *T. marmoratus* se u morfološkom prostoru pozicionira između roditeljskih vrsta, odnosno oblik lobanje se karakteriše intermedijarnim vrednostima. Intermedijarni oblik lobanje hibrida *T. cristatus* × *T. marmoratus* očekivan je s obzirom da su i druge morfološke osobine (npr. broj pršljenova) imaju središnje vrednosti u odnosu na roditeljske vrste (Vallée 1959; Arntzen i sar. 2009; Slijepčević i sar. 2015). Hibrid *T. ivanbureschi* × *T. macedonicus* takođe je intermedijarno postavljen u odnosu na roditeljske vrste. Sličan obrazac utvrđen je i za disparitet u obliku glave tek metamoforziranih jedinki dobijenih eksperimentalnim ukrštanjem.

#### 5.4.2 Uticaj hibridizacije na stabilnost razvića

Primena kompjuterizovane tomografije i metoda 3D geometrijske morfometrije, omogućava veoma preciznu procenu fluktuirajuće asimetrije sa veoma malom greškom merenja (Palmer i Strobeck 1986; Klingenberg 2015). Uzorak ispitivan u okviru ove teze sastoji se od četiri vrste velikih mrmoljaka (jedinke prikupljane iz različitih populacija udaljenih od hibridnih zona) i jedinka prikupljenih iz dve hibridne populacije. Ovakva struktuiranost podataka omogućava da se umanju spoljašnji, sredinski uticaj na FA i ispita uticaj unutrašnjih, genetičkih razlika. Kao što je ranije navedno, ispitivane vrste pripadaju različitim kladama velikih mrmoljaka. Međutim, utvrđeni nivo FA je sličan kod svih vrsta što bi moglo da ukaže na sličan mehanizam puferisanja i amortizacije stresora koji bi mogli da utiču na stabilnost razvića. Odnosno, mehanizam održavanja homeostaze, nasleđen od zajedničkog pretka, vrlo je malo menjan tokom adaptivne radijacije vrsta velikih mrmoljaka.

Glavno pitanje pri ispitivanju stabilnosti razvića, u okviru ovog rada, odnosi se na uticaj hibridizacije na stabilnost razvića. Poznato je da u hibridnim zonama dolazi do promene nivoa stabilnosti razvića (npr. Leary i sar. 1985a,b; Alibert i sar. 1994; Hallgrimson 1988; Auffray i sar. 2001). Kod različitih sojeva miševa je pokazano da hibridizacija utiče na smanjenje FA, odnosno  $F_1$  generacija se odlikuje višim nivoom stabilnosti razvića od roditeljskih vrsta (Bader 1965; Leamy 1984, 1992; Alibert i sar. 1994; Auffray i sar. 1996). Smatra se da je ovakav obrazac dobijen jer su u roditeljskoj generaciji korišćeni uglavnom sojevi dobijeni inbridingom kod kojih je visok nivo homozigotnosti. Međutim, sličan obrazac je dobijen i ukrštanjem roditelja koji nisu dobijeni inbridingom (Auffray i sar. 1996). Takođe, negativna korelacija FA i nivoa heterozigotnosti kod hibrida ustanovljena je i kod primata iz roda *Saguinus* (Hutchinson i Cheverud 1995). Povišen nivo FA hibrida u odnosu na roditeljske vrste nije ustanovljen ni kod ispitivanih žaba iz roda *Hyla* (Lamb i sar. 1990) i *Bombina* (Plăiașu i sar. 2012). Međutim, povišen nivo FA kod hibrida pokazan je kod različitih riba (Graham i Felley 1985; Ferguson 1986; Leary i sar. 1985a,b; Graham 1992), kao i kod jedne vrste guštera (Dosselman i sar. 1998). Takođe, pokazano je da nivo FA može biti i intermedijaran među roditeljskim vrstama kod pastrmke (Wilkins i sar. 1995). Dodatno, eksperimentima na drozofilama pokazano je da se nivo FA može menjati u zavisnosti od

ispitivane hibridne generacije, kao i od ispitivanih osobina (Andersen i sar. 2002; Vishalakshi i Singh 2008).

Dva ispitivana hibrida velikih mrmoljaka odlikuju se različitim karakteristikama životne istorije. Kao što je prethodno navedeno, hibridi *T. cristatus* × *T. marmoratus* su pretežno sterilne jedinke F<sub>1</sub> generacije, dok su hibridi *T. ivanbureschi* × *T. macedonicus* vijabilne, fertilne jedinke F<sub>n</sub> generacije dobijene višegeneracijskim međusobnim ukrštanjem, kao i povratnim ukrštanjem sa roditeljskim vrstama. Sterilnost, odnosno vijabilnost hibrida je direktno povezana sa stepenom genetičke srodnosti među roditeljskim vrstama. Naime, *T. marmoratus* pripada odvojenoj kladi mramorastih mrmoljaka (TM) te je filogenetska udaljenost najverovatnije i razlog sterilnosti hibrida *T. cristatus* i *T. marmoratus*. S druge strane, *T. ivanbureschi* i *T. macedonicus* takođe pripadaju odvojenim kladama (TK i TC, respektivno) ali srodnijim u odnosu na TM i TC kladu. Zbog navedene filogenetske udaljenosti i sterilnosti hibrida, pretpostavljeno je da je nivo FA *T. cristatus* × *T. marmoratus* viši nego kod *T. ivanbureschi* × *T. macedonicus* hibrida, odnosno da vijabilni hibridi *T. ivanbureschi* × *T. macedonicus* imaju stabilnije raziče. Međutim, dobijeni rezultati ukazuju da se nivo FA ne razlikuje između dva hibrida, kao ni između hibrida i roditeljskih vrsta.

Bez obzira na to što nisu pokazane statistički značajne razlike u nivou FA, utvrđene su razlike u asimetriji između vrsta i hibrida. Zajedničko za sve vrste i hibride je to što su asimetrične promene vezane za delove kranijalnog skeleta koji direktno ili indirektno učestvuju u ishrani, dok je smer i veličina promena različit za različite grupe. Ove razlike mogu da budu posledica različitog ponašanja prilikom ishrane, odnosno različitih fizičkih opterećenja koje trpe skeletni elementi koji su direktno uključeni u pridržavanje ili gutanje plena (Lukanov i sar. 2016; Heiss i sar. 2018). Međutim, različiti obrasci variranja FA kod složenih morfoloških celina mogu ukazivati i na razlike u modularnosti i morfološkoj integraciji između vrsta, odnosno roditeljskih vrsta i hibrida (npr. Klingenberg 2015). Dalja istraživanja, koja prevazilaze okvire ove disertacije, mogu dati odgovore na ova pitanja.

Dakle, kod velikih mrmoljaka hibridizacija nema direktan uticaj na stabilnost razvića i na različitim nivoima genetičke odnosno genomske kompatibilnosti. Postoji čitav niz mogućih objašnjenja za dobijeni obrazac FA. S obzirom da ispitivane jedinke potiču iz prirodnih populacija, jedno od mogućih objašnjenja je da prirodna selekcija deluje na ranijim

stupnjevima razvića i uklanja hibridne jedinice sa visokim FA nivoom, kako je pretpostavljeno u slučaju žaba iz roda *Hyla* (Lamb i sar. 1990). U tom smislu, ispitivanje ontogenetskih promena nivoa FA moglo bi da doprinese razjašnjavanju dobijenih obrazaca fluktuirajuće asimetrije i stabilnosti razvića kod različitih vrsta i hibrida velikih mrmoljaka. Takođe, moguće je da kod osobina koje su direktno povezane sa preživljavanjem, kao što je oblik glavenog skeleta, ne dolazi do povećanja FA i pored prisutnog genomskeg stresa.

Iako se nivo FA direktno povezuje sa stabilnošću razvića, i dalje ne postoji solidna teorijska osnova koja bi omogućila direktno tumačenje veze između FA i sredinskog ili genomskeg stresa. Takođe sve više studija, uključujući i rezultate ove disertacije, ukazuje na nepostojanje jasne povezanosti između obrazaca variranja u nivou FA u odnosu na pretpostavljene sredinske ili genomske stresore. Zbog brojnih nekonzistentnosti između očekivanih rezultata i rezultata dobijenih u eksperimentalnim studijama, Bjorksten i sar. (2000) predlažu potpuno napuštanje ovog pravca istraživanja i upotrebe FA kao mere (ne)stabilnosti razvića. Međutim, bez obzira na prisustvo ili odsustvo jasne povezanosti između spoljašnjih i unutrašnjih stresora, varijanse i nivoa FA morfoloških celina, istraživanja stabilnosti i kanalisnosti razvića su neophodna kako zbog boljeg uvida u njihov nastanak tako i zbog njihove ključne uloge u evoluciji razvojnih procesa na mikro- i makroevolucionom nivou (Dongen 2006).

## 6 Zaključci

---

*Triturus macedonicus* odlikuje se nešto višim reproduktivnim performansama (broj i veličina jaja) u odnosu na *T. ivanbureschi*. Visoka varijabilnost reproduktivnih karakteristika među sezonama, ukazuje na značajan uticaj sredinskih faktora na reproduktivni ishod kod obe vrste. Dinamika polaganja jaja razlikuje se među vrstama. Imajući u vidu prethodno utvrđenu veću stopu preživljavanja kod *T. macedonicus* (Cvijanović i sar. 2009), kao i termofilnost *T. macedonicus* (Litvinchuck i sar. 2007), veći reproduktivni potencijal *T. macedonicus* i razlike u dinamici polaganja (ova disertacija), kao i činjenicu da akvatični period *T. macedonicus* traje mesec dana duže nego *T. ivanbureschi* (npr. Wielstra i sar. 2019), može se zaključiti da su upravo ove razlike dale ekološku prednost *T. macedonicus* u odnosu na *T. ivanbureschi* i omogućile širenja areala, makar u njegovim početnim fazama.

Ukrštanjem dve vrste velikih mrmoljaka *T. ivanbureschi* i *T. macedonicus* u laboratorijskim uslovima dobija se vijabilna F<sub>1</sub> hibridna generacija u oba recipročna ukrštanja. S obzirom da u prirodnim populacijama hibridne jedinke imaju mitohondrijsku DNK *T. ivanbureschi*, očekivano je da na nekom nivou ukrštanja deluju izolacioni mehanizmi. Dobijeni fertilni F<sub>1</sub> hibridi u oba ukrštanja, ukazuju da pri početnom ukrštanju ne postoje prezigotske barijere koje bi objasnile asimetričnu introgresiju mitohondrijske DNK.

Hibridizacija utiče na rane karakteristike životne istorije smanjujući vijabilnost jaja. Upravo je ovaj mehanizam jedna od mogućih postzigotskih barijera koja održava uske hibridne zone. S obzirom na to da nisu utvrđene razlike u broju izvaljenih larvi, početno smanjenje broja jaja verovatno dovodi do ukupnog manjeg broja hibridnih jedinki u prirodnim populacijama u odnosu na roditeljske vrste.

Hibridizacija utiče na stopu i brzinu razvića. Roditeljske vrste *T. ivanbureschi* i *T. macedonicus* se međusobno razlikuju, dok se recipročni hibridi odlikuju različitim, ali središnjim vrednostima u odnosu na roditeljske vrste. *Triturus ivanbureschi* se razvija znatno brže u odnosu na *T. macedonicus* i recipročne hibride. Uzimajući u obzir i period polaganja jaja, koji uglavnom započinje i završava se ranije nego kod *T. macedonicus*, gledajući celu

reproduktivnu sezonu, može se zaključiti da *T. ivanbureschi* ranije tokom godine završava sa akvatičnim, larvenim periodom.

Hibridizacija utiče na morfološku varijabilnost velikih mrmoljaka. Rezultujući hibridni fenotipovi razlikuju se od obe roditeljske vrste i uglavnom su intermedijarni, što je i očekivano s obzirom da su hibridi vijabilni. Isti obrazac uticaja hibridizacije na varijabilnost je potvrđen za sve ispitivane karakteristike:

- 1) spoljašnju morfologiju, oblik i veličinu repa larvi;
- 2) veličinu i oblik glave na pet ontogenetskih stupnjeva od izvaljivanja larvi iz zaštitnih opni do završetka metamorfoze;
- 3) veličinu i oblik kranijalnog skeleta kod adultnih jedinki.

Hibridizacija utiče na puteve razvića velikih mrmoljaka. Roditeljske vrste imaju različite, specifične ontogenetske trajektorije. Trajektorije recipročnih hibrida se razlikuju barem od jedne roditeljske vrste i imaju središnje vrednosti atributa ontogenetske trajektorije (pozicija, veličina, pravac i oblik).

Stupanj po izvaljivanju larvi iz zaštitnih omotača, kao i stupanj nakon metamorfoze kada jedinke dolaze u kontakt sa novom, drugačijom spoljašnjom sredinom, odlikuju se znatno većom varijansom u poređenju sa analiziranim stupnjevima tokom larvenog razvića koji su kanalisani, odnosno manje varijabilni.

Iako je bilo očekivano da nakon metamorfoze međugrupna varijabilnost (morfološki disaritet) bude smanjena, kao posledica kanalisnosti razvića i dejstva stabilizacione selekcije, pokazano je da je nivo disariteta na stupnju nakon metamorfoze zapravo najviši, odnosno da su morfološke razlike između roditeljskih vrsta i njihovih hibrida najizraženije nakon metamorfoze. Takođe, unutargupna varijabilnost (varijansa) je visoka kod svih ispitivanih grupa. Moguće je da visok nivo unutar- i međugrupne varijabilnosti omogućava prilagođavanje i veću šansu preživljavanja u novoj terestričnoj, životnoj sredini.

Hibridizacija, kao unutrašnji, genomski stresor ne dovodi do povećanja nivoa FA. Nasuprot očekivanjima, sterilni hibridi dve filogenetski udaljene vrste, fertilni hibridi dve

filogenetski bliže vrste, kao i jedinke sve četiri roditeljske vrste ne pokazuju statistički značajne razlike u nivou FA.

Buduća istraživanja koja proističu iz ove disertacije, kao što su dalja, međusobna ukrštanja F<sub>1</sub> hibrida, kao i povratna ukrštanja sa roditeljskim vrstama, mogu dati odgovore vezane za ustanovljavanje mehanizama koji održavaju hibridne zone velikih mrmoljaka, kao i mehanizme koji dovode do asimetrične introgresije mtDNK.

Takođe, primena savremenih metoda kompjuterizovane tomografije i istraživanja morfološke varijabilnosti embrionskih faza razvića mogu pružiti uvid u promene u razvojnim procesima koje su dovele do morfološke diverzifikacije u okviru roda *Triturus*.

## 7 Literatura

---

- Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J.W., Baird, S.J., Bierne, N., Boughman, J., Brelsford, A., Buerkle, C.A., Buggs, R., Butlin, R.K. 2013. Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, **26**:229–246.
- Ackerly, K.L., Ward, A.B. 2015. Linking vertebral number to performance of aquatic escape responses in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Zoology*, **118**: 394–402.
- Adams, D.C., Collyer, M.L. 2007. Analysis of character divergence along environmental gradients and other covariates. *Evolution*, **61**:510–515.
- Adams, D.C., Collyer, M.L. 2009. A general framework for the analysis of phenotypic trajectories in evolutionary studies. *Evolution*, **63**:1143–1154.
- Adams, M.J., Schindler, D.E., Bury, R.B. 2001. Association of amphibians with attenuation of ultraviolet–B radiation in montane ponds. *Oecologia* **128**:519–525.
- Adams, D.C., Collyer, M.L., Kaliontzopoulou A. 2018. Geomorph: Software for geometric morphometric analyzes. R package version 3.0.6. Dostupno na: <https://cran.r-project.org/package=geomorph>.
- Alarcón-Ríos, L., Velo-Antón, G., Kaliontzopoulou, A. 2017. A non-invasive geometric morphometrics method for exploring variation in dorsal head shape in urodeles: sexual dimorphism and geographic variation in *Salamandra salamandra*. *Journal of Morphology*, **278**:475–485.
- Alberch, P., 1982. The generative and regulatory roles of development in evolution. Environmental adaptation and evolution. Fischer, NY.
- Alberch, P., Gould, S.J., Oster, G.F., Wake, D.B. 1979. Size and shape in ontogeny and phylogeny. *Paleobiology*, **5**:296–317.
- Alibert, P., Renaud, S., Dod, B., Bonhomme, F. Auffray, J.C. 1994. Fluctuating asymmetry in the *Mus musculus* hybrid zone: a heterotic effect in disrupted co-adapted genomes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **258**:53–59.



- Allendorf, F.W., Leary, R.F., Spruell, P., Wenburg, J.K. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**:613–622.
- Andersen, D.H., Pertoldi, C., Scali, V., Loeschcke, V. 2002. Intraspecific hybridization, developmental stability and fitness in *Drosophila mercatorum*. *Evolutionary Ecology Research*, **4**:603–621.
- Arnold, M.L., Hodges, S.A. 1995. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents?. *Trends in Ecology & Evolution*, **10**:67–71.
- Arnold, M.L., Martin, N.H. 2010. Hybrid fitness across time and habitats. *Trends in Ecology & Evolution*, **25**:530–536.
- Arnold, M.L., Kentner, E.K., Johnston, J.A., Cornman, S., Bouck, A.C. 2001. Natural hybridisation and fitness. *Taxon*, 93–104.
- Arnold, S.J. 1992. Constraints on phenotypic evolution. *The American Naturalist*, 140:85–107.
- Arntzen, J.W. 2003. *Triturus cristatus* Superspecies – Kammolch–Artenkreis (*Triturus cristatus* (Laurenti, 1768) – Nördlicher Kammolch, *Triturus carnifex* (Laurenti, 1768) – Italienischer Kammolch, *Triturus dobrogicus* (Kiritzescu, 1903) – Donau–Kammolch, *Triturus karelinii* (Strauch, 1870) – Südlicher Kammolch). Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Schwanzlurche IIA. Aula–Verlag, Wiebelsheim, DE.
- Arntzen, J.W., Hedlund, L. 1990. Fecundity of the newts *Triturus cristatus*, *T. marmoratus* and their natural hybrids in relation to species coexistence. *Ecography*, **13**:325–332.
- Arntzen, J.W., Wallis, G.P. 1991. Restricted gene flow in a moving hybrid zone of the newts *Triturus cristatus* and *T. marmoratus* in western France. *Evolution*, **45**:805–826.
- Arntzen, J.W., Teunis, S.F.M. 1993. A six year study on the population dynamics of the crested newt (*Triturus cristatus*) following the colonization of a newly created pond. *Herpetological Journal*, **3**:99–110.
- Arntzen, J.W., Wallis, G.P. 1994. The ‘Wolterstorff Index’ and its value to the taxonomy of the Crested Newt superspecies. *Abhandlungen und Berichte für Naturkunde*, **17**:57–66.

- Arntzen, J.W., Wallis, G.P. 1999. Geographic variation and taxonomy of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies): morphological and mitochondrial DNA data. *Contributions to Zoology*, **63**:181–203.
- Arntzen, J.W., Jehle, R., Bardakci, F., Burke, T., Wallis, G.P. 2009. Asymmetric viability of reciprocal-cross hybrids between crested and marbled newts (*Triturus cristatus* and *T. marmoratus*). *Evolution*, **63**:1191–1202.
- Arntzen, J.W., Wielstra, B., Wallis, G.P. 2014. The modality of nine *Triturus* newt hybrid zones assessed with nuclear, mitochondrial and morphological data. *Biological Journal of the Linnean Society*, **113**:604–622.
- Arntzen, J.W., Beukema, W., Galis, F., Ivanović, A. 2015. Vertebral number is highly evolvable in salamanders and newts (family Salamandridae) and variably associated with climatic parameters. *Contributions to Zoology*, **84** 85–113.
- Arntzen, J.W., Üzüm, N., Ajduković, M.D., Ivanović, A., Wielstra, B. 2018. Absence of heterosis in hybrid crested newts. *PeerJ*, **6**:e5317.
- Atkinson, J.W. 1992. Conceptual issues in the reunion of development and evolution. *Synthese*, **91**:93–110.
- Auffray, J.C., Alibert, P., Latieule, C., Dod, B. 1996. Relative warp analysis of skull shape across the hybrid zone of the house mouse (*Mus musculus*) in Denmark. *Journal of Zoology*, **240**:441–455.
- Auffray, J.C., Debat, V., Alibert, P. 1999. Shape asymmetry and developmental stability. On growth and form: spatio–temporal pattern formation in biology. Wiley, London, UK.
- Auffray, J.C., Fontanillas, P., Catalan, J., Britton–Davidian, J. 2001. Developmental stability in house mice heterozygous for single Robertsonian fusions. *Journal of Heredity*, **92**:23–29.
- Bader, R.S. 1965. Fluctuating asymmetry in the dentition of the house mouse. *Growth*, **29**:291–300.
- Barton, N.H., Hewitt, G.M. 1985. Analysis of hybrid zones. *Annual review of Ecology and Systematics*, **16**:113–148.

- Barton, N.H., Hewitt, G.M. 1989. Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*, **341**:497–503.
- Bell, G. 1977. The life of the smooth newt (*Triturus vulgaris*) after metamorphosis. *Ecological Monographs*, **41**:279–299.
- Berven, K.A., Chandra, B.G. 1988. The relationship among egg size, density and food level on larval development in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Oecologia*, **75**:67–72.
- Bininda-Emonds, O.R., Jeffery, J.E., Coates, M.I., Richardson M.K. 2002. From Haeckel to event – pairing: the evolution of developmental sequences. *Theory in Biosciences*, **121**:297–320.
- Bjorksten, T.A., Fowler, K., Pomiankowski, A. 2000. What does sexual trait FA tell us about stress? *Trends in Ecology & Evolution*, **15**:163–166.
- Bonett, R.M., Blair A.L. 2017. Evidence for complex life cycle constraints on salamander body form diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**:9936–9941.
- Bonett, R.M., Phillips, J.G., Ledbetter, N.M., Martin, S.D., Lehman, L. 2018. Rapid phenotypic evolution following shifts in life cycle complexity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **285**:20172304.
- Bookstein, F.L. 1997. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge University Press. UK.
- Brede, E.G., Thorpe, R.S., Arntzen, J.W., Langton, T.E.S. 2000: A morphometric study of a hybrid newt population (*Triturus cristatus*/*T. carnifex*): Beam Brook Nurseries, Surrey, UK. *Biological Journal of the Linnean Society*, **70**:685–695.
- Buggs, R.J.A. 2007. Empirical study of hybrid zone movement. *Heredity*, **99**:301–312.
- Burke, J.M., Arnold, M.L. 2001. Genetics and the fitness of hybrids. *Annual review of genetics*, **35**:31–52.
- Clarke, G.M. 1993. The genetic basis of developmental stability. I. Relationships between stability, heterozygosity and genomic coadaptation. *Genetica*, **89**:15–23.

- Cogălniceanu, D., Buhaciuc, E., Tudor, M., Rosioru, D. 2013. Is reproductive effort environmentally or energetically controlled? The case of the Danube Crested Newt (*Triturus dobrogicus*). *Zoological Science*, **30**:924–929.
- Collyer, M.L., Adams, D.C. 2007. Analysis of two-state multivariate phenotypic change in ecological studies. *Ecology*, **88**:683–692.
- Collyer, M.L., Adams, D.C. 2013. Phenotypic trajectory analysis: comparison of shape change patterns in evolution and ecology. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, **24**:75–83.
- Coyne, J.A., Orr, H.A. 2004. Speciation. Sinauer, Sunderland, MA.
- Crispo, E., Moore, J.S., Lee-Yaw, J.A., Gray, S.M., Haller, B.C. 2011. Broken barriers: human-induced changes to gene flow and introgression in animals: an examination of the ways in which humans increase genetic exchange among populations and species and the consequences for biodiversity. *BioEssays*, **33**:508–518.
- Crnobrnja-Isailović, J., Džukić, G., Krstić, N., Kalezić, M.L. 1997. Evolutionary and paleogeographical effects on the distribution of the *Triturus cristatus* superspecies in the central Balkans. *Amphibia-Reptilia*, **18**:321–332.
- Cvijanović, M., Ivanović, A., Tomašević Kolarov, N., Džukić, G., Kalezić, M.L. 2009. Early ontogeny shows the same interspecific variation as natural history parameters in the crested newt (*Triturus cristatus* superspecies)(Caudata, Salamandridae). *Contributions to Zoology*, **78**:43–50.
- Cvijanović, M., Ivanović, A., Kalezić, M.L., Zelditch, M.L. 2014. The ontogenetic origins of skull shape disparity in the *Triturus cristatus* group. *Evolution and Development*, **16**:306–317.
- Cvijanović, M., Ivanović, A., Kalezić, M.L. 2015. Larval pigmentation patterns of closely related newt species (*Triturus cristatus* and *T. dobrogicus*) in laboratory conditions. *North-Western Journal of Zoology*, **11**:357–359.
- Díaz-Paniagua, C. 1989. Oviposition behavior of *Triturus marmoratus pygmaeus*. *Journal of Herpetology*, **23**:159–163.

- Dobzhansky, T. 1937. Genetic nature of species differences. *The American Naturalist*, **71**:404–420.
- Dongen, S.V. 2006. Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, present and future. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**:1727–1743.
- Dosselman, D.J., Schaalje, G.B., Sites, J.W. 1998. An analysis of fluctuating asymmetry in a hybrid zone between two chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Squamata: Phrynosomatidae) in Central Mexico. *Herpetologica*, **54**:434–447.
- Dryden, I.L., Mardia, K.V. 1998. Statistical shape analysis (Vol. 4). John Wiley & Sons, New York, USA.
- Duboule, D. 1994. Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. *Development*, **1994**:135–142.
- Duellman, W.E., Trueb, L. 1986. Biology of Amphibians. McGraw Hill, New York, USA.
- Dvořák, J., Gvoždík, L. 2009. Oviposition preferences in newts: does temperature matter? *Ethology*, **115**:533–539.
- Džukić, G., Cvijanović, M., Urošević, A., Vukov, T.D., Tomašević Kolarov, N., Slijepčević, M., Ivanović, A., Kalezić, M.L. 2015. Batrahološka zbirka Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković”, Univerziteta u Beogradu. *Bulletin of the Natural History Museum*, **8**:118–167.
- Džukić, G., Vukov, T.D., Kalezić, M.L. 2016. Repati vodozemci Srbije. SANU, Beograd, Srbija.
- Ferguson, M.M. 1986. Developmental stability of rainbow trout hybrids: genomic coadaptation or heterozygosity? *Evolution*, **40**:323–330.
- Francillon-Vieillot, H., Arntzen, J.W., Géraudie, J. 1990. Age, growth and longevity of sympatric *Triturus cristatus*, *T. marmoratus* and their hybrids (Amphibia, Urodela): a skeletochronological comparison. *Journal of Herpetology*, **24**:13–22.

- Furtula, M., Ivanović, A., Džukić, G., Kalezić, M.L. 2008. Egg size variation in crested newts from the western Balkans (Caudata, Salamandridae, *Triturus cristatus* superspecies). *Zoological Studies*, **47**:585–590.
- Furtula, M., Todorović, B., Simić, V., Ivanović, A. 2009. Interspecific differences in early life-history traits in crested newts (*Triturus cristatus* superspecies, Caudata, Salamandridae) from the Balkan Peninsula. *Journal of Natural History*, **43**:469–477.
- Galis, F., Metz, J.A. 2001. Testing the vulnerability of the phylotypic stage: on modularity and evolutionary conservation. *Journal of Experimental Zoology*, **291**:195–204.
- Galis, F., Metz, J.A. 2007. Evolutionary novelties: the making and breaking of pleiotropic constraints. *Integrative and Comparative Biology*, **47**:409–419.
- Galis, F., Metz, J.A., van Alphen, J.J., 2018. Development and evolutionary constraints in animals. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **49**:499–522.
- Gilbert, S.F. 2010. Developmental biology– 9<sup>th</sup> edition. Sinauer Associates Inc, Sunderland, USA.
- Glücksohn, S. 1932. Äußere Entwicklung der Extremitäten und Stadieneinteilung der Larvenperiode von *Triton taeniatus* Leyd. und von *Triton cristatus* Laur. *Wilhelm Roux' Archiv f. Entwicklungsmechanik d. Organismen*, **125**:341–405.
- Gould, S.J. 1977. Ontogeny and phylogeny. Harvard University Press. Harvard, USA
- Govedarica, P., Cvijanović, M., Slijepčević, M., Ivanović, A. 2017. Trunk elongation and ontogenetic changes in the axial skeleton of *Triturus* newts. *Journal of Morphology*, **278**:1577–1585.
- Graham, J.H. 1992. Genomic coadaptation and developmental stability in hybrid zones. *Acta Zoologica Fennica*, **191**:121–131.
- Graham, J.H., Felley, J.D. 1985. Genomic coadaptation and developmental stability within introgressed populations of *Ennenconrhus gloriosus* and *E. obesus* (Pisces, Centrarchidae). *Evolution*, **39**:104–114.

- Graham, J.H., Raz, S., Hel-Or, H., Nevo, E. 2010. Fluctuating asymmetry: methods, theory, and applications. *Symmetry*, **2**:466-540.
- Griffiths, R.A., de Wijer, P. 1994. Differential effects of pH and temperature on embryonic development in the British newts (*Triturus*). *Journal of Zoology*, **234**:613–622.
- Griffiths, R. Teunis, B. 1996. Newts and salamanders of Europe. T & AD Poyser, London, UK.
- Gunz, P., Mitteroecker, P. 2013. Semilandmarks: a method for quantifying curves and surfaces. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, **24**:103–109.
- Gvoždík, L. 2012. Metabolic costs of hybridization in newts. *Folia Zoologica*, **61**:197–202.
- Gvoždík, L., Van Damme, R. 2006. *Triturus* newts defy the running–swimming dilemma. *Evolution*, **60**:2110–2121.
- Haeckel, E. 1866. Generelle Morphologie der Organismen. Allgemeine Grundzüge der organischen Formen–Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von C. Darwin reformirte Descendenz–Theorie, etc (Vol. 2). Reimer, Berlin, Germany.
- Hall, B.K. 1992. Evolutionary Developmental Biology. Chapman and Hall, London, UK.
- Hall, B.K. 1996. Bauplane, phylotypic stages, and constraint—Why there are so few types of animals. *Evolutionary Biology*, **29**:215–261.
- Hall, B.K. 1999. Evolutionary Developmental Biology. Springer, Dordrecht, NL.
- Hallgrímsson, B., 1988. Fluctuating asymmetry in the mammalian skeleton. Evolutionary biology. Springer, Boston, MA.
- Hallgrímsson, B., Mio, W., Marcucio, R.S., Spritz, R. 2014. Let's face it – complex traits are just not that simple. *PLOS Genetics*, **10**:1004724.
- Hallgrímsson, B., Green, R.M., Katz, D.C., Fish, J.L., Bernier, F.P., Roseman, C.C., Young, N.M., Cheverud, J.M., Marcucio, R.S. 2019. The developmental-genetics of canalization. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **88**:67–79.
- Hanken, J. 1989. Development and evolution in amphibians. *American Scientist*, **77**:336–343.

- Hanken, J. 1992. Life history and morphological evolution. *Journal of Evolutionary Biology*, **5**:549–557.
- Hanken, J., Jennings, D.H., Olsson, L. 1997. Mechanistic basis of life–history evolution in anuran amphibians: direct development. *American Zoologist*, **37**:160–171.
- Harris, R.N. 1989. Ontogenetic changes in size and shape of the facultatively paedomorphic salamander *Notophthalmus viridescens dorsalis*. *Copeia*, 35–42.
- Harrison, R.G. 1993. Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University Press, UK.
- Harrison, R.G., Larson, E.L. 2014. Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *Journal of Heredity* **105**:795–809.
- Hendrikse, J.L., Parsons, T.E., Hallgrímsson, B. 2007. Evolvability as the proper focus of evolutionary developmental biology. *Evolution and Development*, **9**:393–401.
- Heiss, E., Aerts, P., Wassenbergh, S.V. 2018. Aquatic–terrestrial transitions of feeding systems in vertebrates: a mechanical perspective. *Journal of Experimental Biology*, **221**:jeb154427.
- Hewitt, G.M. 1988. Hybrid zones – natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology & Evolution*, **3**:158–167.
- Hewitt, G.M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**:907–913.
- Hutchison, D.W., Cheverud, J.M. 1995. Fluctuating asymmetry in tamarin (*Saguinus*) cranial morphology: intra–and interspecific comparisons between taxa with varying levels of genetic heterozygosity. *Journal of Heredity*, **86**:280–288.
- Istock, C.A. 1967. The evolution of complex life cycle phenomena: an ecological perspective. *Evolution*, **21**:592–605.
- Ivanović, A., Arntzen, J.W. 2014. Evolution of skull and body shape in *Triturus* newts reconstructed from three–dimensional morphometric data and phylogeny. *Biological Journal of the Linnean Society*, **113**:243–255.



- Ivanović, A., Vukov, T.D., Džukić, G., Tomašević, N., Kalezić, M.L. 2007. Ontogeny of skull size and shape changes within a framework of biphasic lifestyle: a case study in six *Triturus* species (Amphibia, Salamandridae). *Zoomorphology*, **126**:173–183.
- Ivanović, A., Tomašević, N., Džukić, G., Kalezić, M.L. 2008a. Evolutionary diversification of the limb skeleton in crested newts (*Triturus cristatus* superspecies, Caudata, Salamandridae). *Acta Zoologica Fennica*, **45**:527–535.
- Ivanović, A., Sotiropoulos, K., Vukov, T.D., Eleftherakos, K., Džukić, G., Polymeni, R.M., Kalezić, M.L. 2008b. Cranial shape variation and molecular phylogenetic structure of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies: Caudata, Salamandridae) in the Balkans. *Biological Journal of the Linnean Society*, **95**:348–360.
- Ivanović, A., Cvijanović, M., Kalezić, M.L. 2011. Ontogeny of body form and metamorphosis: insights from the crested newts. *Journal of Zoology*, **283**:153–161.
- Ivanović, A., Üzümlü, N., Wielstra, B., Olgun, K., Litvinchuk, S.N., Kalezić, M.L., Arntzen, J.W. 2013. Is mitochondrial DNA divergence of Near Eastern crested newts (*Triturus karelinii* group) reflected by differentiation of skull shape?. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, **252**:269–277.
- Jiggins, C.D., Mallet, J. 2000. Bimodal hybrid zones and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**:250–255.
- Kaplan, R.H., Salthe, S.N. 1979. The allometry of reproduction: an empirical view in salamanders. *The American Naturalist*, **113**:671–689.
- Kalezić, M.L., Cvetković, D., Đorović, A., Džukić, G. 1994. Paedomorphosis and differences in life–history traits of two neighbouring crested newt (*Triturus carnifex*) populations. *Herpetological Journal*, **4**:151–158.
- Klingenberg, C.P. 1998. Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biological Reviews*, **73**:79–123.
- Klingenberg, C.P. 2002. Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene*, **287**:3–10.

- Klingenberg, C.P. 2010. Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nature Reviews Genetics*, **11**:623–635.
- Klingenberg, C.P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, **11**:353–357.
- Klingenberg, C.P. 2013. Visualizations in geometric morphometrics: how to read and how to make graphs showing shape changes. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, **24**:15–24.
- Klingenberg, C.P. 2015. Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: concepts, methods, and applications. *Symmetry*, **7**:843–934.
- Klingenberg, C.P. 2016. Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Development Genes and Evolution*, **226**:113–137.
- Klingenberg, C.P. 2019. Phenotypic plasticity, developmental instability, and robustness: the concepts and how they are connected. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **7**:56
- Klingenberg, C.P., McIntyre, G.S. 1998. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution*, **52**:1363–1375.
- Klingenberg, C.P., Barluenga, M., Meyer, A. 2002. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution*, **56**:1909–1920.
- Kurdíková, V., Smolinský, R., Gvoždík, L. 2011. Mothers matter too: benefits of temperature oviposition preferences in newts. *PLoS One*, **6**:p.e23842.
- Lamb, T., Novak, J.M., Mahoney, D.L. 1990. Morphological asymmetry and interspecific hybridization: a case study using hylid frogs. *Journal of Evolutionary Biology*, **3**:295–309.
- Larson, P.M. 2002. Chondrocranial development in larval *Rana sylvatica* (Anura: Ranidae): morphometric analysis of cranial allometry and ontogenetic shape change. *Journal of Morphology*, **252**:131–144.

- Larson, P.M. 2004. Chondrocranial morphology and ontogenetic allometry in larval *Bufo americanus* (Anura, Bufonidae). *Zoomorphology*, **123**:95–106.
- Larson, P.M. 2005. Ontogeny, phylogeny, and morphology in anuran larvae: morphometric analysis of cranial development and evolution in *Rana* tadpoles (Anura: Ranidae). *Journal of Morphology*, **264**:34–52.
- Leamy, L. 1984. Morphometric studies in inbred and hybrid house mice. V. Directional and fluctuating asymmetry. *The American Naturalist*, **123**:579–593.
- Leamy, L. 1992. Morphometric studies in inbred and hybrid house mice. VII. Heterosis in fluctuating asymmetry at different ages. *Acta Zoologica Fennica*, **191**:111–119.
- Leary, R.F., Allendorf, F.W., Knudsen, K.L., Thorgaard, G.H. 1985a. Heterozygosity and developmental stability in gynogenetic diploid and triploid rainbow trout. *Heredity*, **54**:219–225.
- Leary, R.F., Allendorf, F.W., Knudsen, K.L. 1985b. Developmental instability and high meristic counts in interspecific hybrids of salmonid fishes. *Evolution*, **39**:1318–1326.
- Lebedkina, N.S. 2004. Evolution of amphibian skull (Vol. 9). Pensoft, Sofia, BG.
- Litvinchuk, S. N., Borkin, L.J. 2009. Evolution, systematics and distribution of crested newts (*Triturus cristatus* complex) in Russia and adjacent countries. Evropejski Dom, Sankt–Peterburg, RU.
- Litvinchuk, S.N., Rosanov, J.M., Borkin, L.J. 2007. Correlations of geographic distribution and temperature of embryonic development with the nuclear DNA content in the Salamandridae (Urodela, Amphibia). *Genome*, **50**:333–342.
- Liu, H., Wassersug, R., Kawachi, K. 1996. A computational fluid dynamics study of tadpole swimming. *Journal of Experimental Biology*, **199**:1245–1260.
- Loman, J. 2002. Microevolution and maternal effects on tadpole *Rana temporaria* growth and development rate. *Journal of Zoology*, **257**:93–99.

- Lukanov, S., Tzankov, N., Handschuh, S., Heiss, E., Naumov, B., Natchev, N. 2016. On the amphibious food uptake and prey manipulation behavior in the Balkan-Anatolian crested newt (*Triturus ivanbureschi*, Arntzen i Wielstra, 2013). *Zoology*, **119**:224–231.
- Macgregor, H.C., Horner, H. 1980. Heteromorphism for chromosome 1, a requirement for normal development in crested newts. *Chromosoma*, **76**:111–122.
- Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**:229–237.
- Marco, A., Lizana, M., Alvarez, A., Blaustein, A.R. 2001. Egg–wrapping behaviour protects newt embryos from UV radiation. *Animal Behavior*, **61**:639–644.
- Mayr, E. 1963. Animal species and evolution. Oxford University Press. London, UK.
- Mettouris, O., Dalmyras, D., Giokas, S. 2017. Influence of temperature on female, embryonic and hatchling traits in syntopic newts, *Ichthyosaura alpestris* and *Lissotriton vulgaris*. *Journal of Thermal Biology*, **63**:24–30.
- Miaud, C. 1993. Predation on newt eggs (*Triturus alpestris* and *T. helveticus*): identification of predators and protective role of oviposition behavior. *Journal of Zoology*, **231**:575–581.
- Miaud, C. 1994. Role of wrapping behavior on egg survival in three species of *Triturus* (Amphibia: Urodela). *Copeia*, **1994**:535–537.
- Miaud, C. 1995. Oviposition site selection in three species of European newts (Salamandridae) genus *Triturus*. *Amphibia–Reptilia*, **16**:265–272.
- Mitteroecker, P., Gunz, P., Bernhard, M., Schaefer, K., Bookstein, F.L. 2004. Comparison of cranial ontogenetic trajectories among great apes and humans. *Journal of Human Evolution*, **46**:679–698.
- Monteiro, L.R. 1999. Multivariate regression models and geometric morphometrics: the search for causal factors in the analysis of shape. *Systematic Biology*, **48**:192–199.
- Moran, N.A. 1994. Adaptation and constraint in the complex life cycles of animals. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **25**:573–600.

- Nolte, A.W., Tautz, D. 2010. Understanding the onset of hybrid speciation. *Trends in Genetics*, **26**:54–58.
- Orizaola, G., Braña, F. 2003. Oviposition behaviour and vulnerability of eggs to predation in four newt species (genus *Triturus*). *Herpetological Journal*, **13**:121–124.
- Palen, W.J., Williamson, C.E., Clauser, A.A., Schindler, D.E. 2005. Impact of UV–B exposure on amphibian embryos: linking species physiology and oviposition behavior. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **272**:1227–1234.
- Palmer, A.R., Strobeck, C. 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual review of Ecology and Systematics*, **17**:391–421.
- Parsons, P.A. 1990. Fluctuating asymmetry: an epigenetic measure of stress. *Biological reviews*, **65**:131–145
- Piett, S., Hager, H.A., Gerrard, C. 2015. Characteristics for evaluating the conservation value of species hybrids. *Biodiversity and Conservation*, **24**:1931–1955.
- Plăiașu, R., Vörös, J., Băncilă, R. 2012. Fluctuating asymmetry as a tool in identifying population stress in Hungarian populations of *Bombina bombina*, *B. variegata* and their hybrids. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, **58**:361–368.
- Ponssa, M.L., Candiotti, M.F.V. 2012. Patterns of skull development in anurans: size and shape relationship during postmetamorphic cranial ontogeny in five species of the *Leptodactylus fuscus* group (Anura: Leptodactylidae). *Zoomorphology*, **131**:349–362.
- Prokić, M.D., Despotović, S.G., Vučić, T.Z., Petrović, T.G., Gavrić, J.P., Gavrilović, B.R., Radovanović, T.B., Saičić, Z.S. 2018. Oxidative cost of interspecific hybridization: a case study of two *Triturus* species and their hybrids. *The Journal of Experimental Biology*, **221**:jeb182055.
- Raff, R.A. 1996. *The shape of life: genes, development, and the evolution of animal form*. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Rafińska, A. 1991. Reproductive biology of the fire–bellied toads, *Bombina bombina* and *B. variegata* (Anura: Discoglossidae): egg size, clutch size and larval period length differences. *Biological Journal of the Linnean Society*, **43**:197–210.

- Ratnikov, V.Yu., Litvinchuk S.N. 2007. Comparative morphology of trunk and sacral vertebrae of tailed amphibians of Russia and adjacent countries. *Russian Journal of Herpetology*, **14**: 177–190.
- Ratnikov, V.Yu., Litvinchuk, S.N. 2009. Atlantal vertebra of tailed amphibians of Russia and adjacent countries. *Russian Journal of Herpetology*, **16**: 57–68.
- Reilly, S.M., Wiley, E.O., Meinhardt, D.J. 1997. An integrative approach to heterochrony: the distinction between interspecific and intraspecific phenomena. *Biological Journal of the Linnean Society*, **60**:119–143.
- Reyer, H., Frei, G., Som, C. 1999. Cryptic female choice: frogs reduce clutch size when amplexed by undesired males. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **266**:2101–2107.
- Richardson, M.K. 1999. Vertebrate evolution: the developmental origins of adult variation. *BioEssays* **21**:604–613.
- Rohlf, F.J. 2000. On the use of shape spaces to compare morphometric methods. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, **11**:1.
- Rohlf, F.J. 2006. tpsDig, version 2.26. State University of New York, Stony Brook, New York, USA. Dostupno na: <http://life.bio.sunysb.edu/morph>.
- Rohlf, F.J., Slice, D. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology*, **39**:40–59.
- Sander, K. 1983. The evolution of patterning mechanisms: gleanings from insect embryogenesis. Development and evolution. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Schlager, S. 2017. Morpho and Rvcg–Shape Analysis in R: R–Packages for geometric morphometrics, shape analysis and surface manipulations. Statistical shape and deformation analysis. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Schmalhausen, I.I. 1949. Factors of evolution: the theory of stabilizing selection. Blakiston, Oxford, UK.

- Seehausen, O. 2004. Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**:198–207.
- Sheets, H.D. 2000. Integrated morphometrics package (IMP). Dostupno na: <http://www2.canisius.edu/~sheets>.
- Sheets, H.D., Zelditch, M.L. 2013. Studying ontogenetic trajectories using resampling methods and landmark data. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, **24**:67–73.
- Sherratt, E., Vidal–García, M., Anstis, M., Keogh, J.S. 2017. Adult frogs and tadpoles have different macroevolutionary patterns across the Australian continent. *Nature Ecology Evolution*, **1**: e1385.
- Slijepčević, M., Galis, F., Arntzen, J.W., Ivanović, A. 2015. Homeotic transformations and number changes in the vertebral column of *Triturus* newts. *PeerJ*, **3**:e1397.
- Smith, A.B., Littlewood, D.T.J., Wray, G.A. 1995. Comparing patterns of evolution: larval and adult life history stages and ribosomal RNA of post–Palaeozoic echinoids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **349**: 11–18.
- Smith, F.J., Percival, C.J., Young, N.M., Hu, D., Schneider, R.A., Marcucio, R.S., Hallgrímsson, B. 2015a. Divergence of craniofacial developmental trajectories among avian embryos. *Developmental Dynamics*, **244**:1158–1167.
- Smith G.D., Hopkins G.R., Mohammadi S., Skinner H.M., Hansen T., Brodie E.D., French S.S. 2015b. Effects of temperature on embryonic and early larval growth and development in the rough skinned newt (*Taricha granulosa*). *Journal of Thermal Biology*, **51**:89–95.
- Steinfartz, S., Vicario, S., Arntzen, J.W., Caccone, A. 2007. A Bayesian approach on molecules and behavior: reconsidering phylogenetic and evolutionary patterns of the Salamandridae with emphasis on *Triturus* newts. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, **308**:139–162.
- Strauss, R.E. 1992. Developmental variability and heterochronic evolution in poeciliid fishes (Cyprinodontiformes). Systematics, Historical Ecology, and North American Freshwater Fishes. Stanford University Press, Stanford, USA.

- Strauss, R.E., Altig, R. 1992. Ontogenetic body form changes in three ecological morphotypes of anuran tadpoles. *Growth, Development and Aging*, **56**:3–16.
- Takahama, H., Sasaki, F., Watanabe, K. 1988. Morphological changes in the oral (buccopharyngeal) membrane in urodelan embryos: development of the mouth opening. *Journal of Morphology*, **195**:59–69.
- Takahashi, K.H. 2019. Multiple modes of canalization: links between genetic, environmental canalizations and developmental stability, and their trait–specificity. *Seminars in cell & developmental biology*, **88**:14–20.
- Tomašević Kolarov, N., Ivanović, A., Kalezić, M.L. 2011. Morphological integration and ontogenetic niche shift: a study of crested newt limbs. *Journal of Experimental Zoology Part B*, **316**:296–305.
- Tóth, Z. 2015. Context–dependent plastic response during egg–laying in a widespread newt species. *PLoS One*, **10**:e0136044.
- Toews, D.P.L., Brelsford, A. 2012. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*, **21**:3907–3930.
- Trueb, L. 1993. Patterns of cranial diversity among the Lissamphibia. The skull 2. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Urošević, A., Slijepčević, M.D., Arntzen, J.W., Ivanović, A. 2016. Vertebral shape and body elongation in *Triturus* newts. *Zoology*, **119**:439–446
- Valero, K.C.W., Garcia-Porta, J., Rodríguez, A., Arias, M., Shah, A., Randrianiaina, R.D., Brown, J.L., Glaw, F., Amat, F., Künzel, S., Metzler, D., Isokpehi, R.D., Vences, M. 2017. Transcriptomic and macroevolutionary evidence for phenotypic uncoupling between frog life history phases. *Nature Communications*, **8**:15213.
- Vallée, L. 1959. Recherches sur *Triturus blasii* de l'Isle, hybride naturel de *Triturus cristatus* Laur. × *Triturus marmoratus* Latr. *Bulletin de la Société zoologique de France*, **31**:1–95.
- Van Buskirk, J. 2009. Natural variation in morphology of larval amphibians: Phenotypic plasticity in nature? *Ecological Monographs*, **79**:681–705.



- Van Buskirk, J. 2011. Amphibian phenotypic variation along a gradient in canopy cover: species differences and plasticity. *Oikos*, **120**:906–914.
- Van Buskirk, J., McCollum, S.A. 2000. Functional mechanisms of an inducible defense in tadpoles: morphology and behavior influence mortality risk from predation. *Journal of Evolutionary Biology*, **13**:336–347.
- Van Buskirk, J., Schmidt, B.R. 2000. Predator-induced phenotypic plasticity in larval newts: trade-offs, selection, and variation in nature. *Ecology*, **81**:3009–3028.
- Van Buskirk, J., McCollum, S.A., Werner, E.E. 1997. Natural selection for environmentally induced phenotypes in tadpoles. *Evolution*, **51**:1983–1992.
- Van Buskirk, J., Anderwald, P., Lüpold, S., Reinhardt, L., Schuler, H. 2003. The lure effect, tadpole tail shape, and the target of dragonfly strikes. *Journal of Herpetology*, **37**:420–424.
- Van Valen, L. 1962. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution*, **16**:125–142.
- Verrell, P.A., Francillon, H. 1986. Body size, age and reproduction in the smooth newt, *Triturus vulgaris*. *Journal of Zoology*, **210**:89–100
- Vinšálková, T., Gvoždík, L. 2007. Mismatch between temperature preferences and morphology in F<sub>1</sub> hybrid newts (*Triturus carnifex* × *T. dobrogicus*). *Journal of Thermal Biology*, **32**:433–439.
- Vishalakshi, C., Singh, B.N. 2008. Fluctuating asymmetry in hybrids of sibling species, *Drosophila ananassae* and *Drosophila pallidosa*, is trait and sex specific. *Journal of Heredity*, **100**:181–191.
- Von Baer, K.E. 1828. *Über Entwicklungsgeschichte der Thiere: Beobachtung und Reflexion* (Vol. 1). Bornträger, Königsberg, DE.
- Vučić, T., Vukov, T.D., Tomašević Kolarov, N., Cvijanović, M. Ivanović, A. 2018. The study of larval tail morphology reveals differentiation between two *Triturus* species and their hybrids. *Amphibia–Reptilia*, **39**:87–97.

- Vučić, T., Sibinović, M., Vukov, T.D., Tomašević Kolarov, N., Cvijanović, M. Ivanović, A. 2019. Testing the evolutionary constraints of metamorphosis: the ontogeny of head shape in *Triturus* newts. *Evolution*, **73**:1253–1264.
- Vukov, T.D., Sotiropoulos, K., Wielstra, B., Džukić, G., Kalezić, M.L. 2011. The evolution of the adult body form of the crested newt (*Triturus cristatus* superspecies, Caudata, Salamandridae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **49**:324–334.
- Vukov, T., Kuručki, M., Anđelković, M., Tomašević Kolarov, N. 2018. Post–metamorphic ontogenetic changes in head size and shape of the pool frog (*Pelophylax lessonae*, Ranidae). *Archives of Biological Sciences*, **70**:307–312.
- Waddington, C.H. 1942. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, **150**:563.
- Waddington, C.H. 1953. Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution*, **7**:118–126.
- Waddington, C.H. 1957. *The Strategy of Genes*. MacMillan Co., New York, USA.
- Wagner, G.P., Altenberg, L. 1996. Perspective: complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution*, **50**:967–976.
- Wagner, G.P., Booth, G., Bagheri–Chaichian, H. 1997. A population genetic theory of canalization. *Evolution*, **51**:329–347.
- Wake, D.B. 2009. What salamanders have taught us about evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **40**:333–352.
- Wallis, G.P., Arntzen, J.W. 1989. Mitochondrial DNA variation in the crested newt superspecies: limited cytoplasmic gene flow among species. *Evolution*, **43**:88–104.
- Wassersug, R.J. 1989. Locomotion in amphibian larvae (or “Why aren't tadpoles built like fishes?”). *American Zoologist*, **29**:65–84.
- Wassersug, R.J., Hoff, K.V.S. 1985. The kinematics of swimming in anuran larvae. *Journal of Experimental Biology*, **119**:1–30.

- Webb, P.W. 1984. Body form, locomotion and foraging in aquatic vertebrates. *American Zoologist*, **24**:107–120.
- Webster, M., Zelditch, M.L. 2005. Evolutionary modifications of ontogeny: heterochrony and beyond. *Paleobiology*, **31**:354–372.
- Weihs, D. 1989. Design features and mechanics of axial locomotion in fish. *American Zoologist*, **29**:151–160.
- Wielstra, B., 2019. Historical hybrid zone movement: More pervasive than appreciated. *Journal of Biogeography*, <https://doi.org/10.1111/jbi.13600>.
- Wielstra, B., Arntzen, J.W. 2011. Unraveling the rapid radiation of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies) using complete mitogenomic sequences. *BMC Evolutionary Biology*, **11**:1.
- Wielstra, B., Arntzen, J.W. 2012. Postglacial species displacement in *Triturus* newts deduced from asymmetrically introgressed mitochondrial DNA and ecological niche models. *BMC Evolutionary Biology*, **12**:161.
- Wielstra, B., Arntzen, J.W. 2014. Kicking *Triturus arntzeni* when it's down: large-scale nuclear genetic data confirm that newts from the type locality are genetically admixed. *Zootaxa*, **3802**:381–388.
- Wielstra, B., Arntzen, J.W., van der Gaag, K.J., Pabijan, M., Babik, W. 2014a. Data concatenation, bayesian concordance and coalescent-based analyses of the species tree for the rapid radiation of *Triturus* newts. *PloS one*, **9**:e111011.
- Wielstra, B., Sillero, N., Vörös, J., Arntzen, J.W. 2014b. The distribution of the crested and marbled newt species (Amphibia: Salamandridae: *Triturus*) – an addition to the New Atlas of Amphibians and Reptiles of Europe. *Amphibia–Reptilia*, **35**:376–381.
- Wielstra, B., Duijm, E., Lagler, P., Lammers, Y., Meilink, W.R.M., Ziermann, J.M., Arntzen, J.W. 2014c. Parallel tagged amplicon sequencing of transcriptome-based genetic markers for *Triturus* newts with the Ion Torrent next-generation sequencing platform. *Molecular Ecology Resources*, **14**:1080–1089.

- Wielstra, B., Burke, T., Butlin, R.K., Schaap, O., Shaffer, H.B., Vrieling, K., Arntzen, J.W. 2016. Efficient screening for ‘genetic pollution’ in an anthropogenic crested newt hybrid zone. *Conservation Genetics Resources*, **8**:553–560.
- Wielstra, B., Burke, T., Butlin, R.K., Arntzen, J.W. 2017. A signature of dynamic biogeography: enclaves indicate past species replacement. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **284**:20172014.
- Wielstra, B., McCartney–Melstad, E., Arntzen, J.W., Butlin, R.K., Shaffer, H.B. 2019. Phylogenomics of the adaptive radiation of *Triturus* newts supports gradual ecological niche expansion towards an incrementally aquatic lifestyle. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **133**:120–127.
- Wiens, J.J., Bonett, R.M., Chippindale, P.T. 2005. Ontogeny discombobulates phylogeny: paedomorphosis and higher–level salamander relationships. *Systematic Biology*, **54**:91–110.
- Wilkins, N.P., Gosling, E., Curatolo, A., Linnane, A., Jordan, C. Courtney, H.P. 1995. Fluctuating asymmetry in Atlantic salmon, European trout and their hybrids, including triploids. *Aquaculture*, **137**:77–85.
- Willmore, K.E., Young, N.M., Richtsmeier, J.T. 2007. Phenotypic variability: its components, measurement and underlying developmental processes. *Evolutionary Biology*, **34**:99–120.
- Zelditch, M.L., Fink, W.L. 1996. Heterochrony and heterotopy: stability and innovation in the evolution of form. *Paleobiology*, **22**:241–254.
- Zelditch, M.L., Sheets, H.D., Fink, W.L. 2000. Spatiotemporal reorganization of growth rates in the evolution of ontogeny. *Evolution*, **54**:1363–1371.
- Zelditch, M.L., Sheets, H.D., Fink, W.L. 2003. The ontogenetic dynamics of shape disparity. *Paleobiology*, **29**:139–156.
- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D. 2012. Geometric morphometrics for biologists: a primer. 2<sup>nd</sup> Edition. Elsevier/Academic Press Cambridge, Massachusetts, USA.

## 8 Prilozi

---

**Prilog 1.** Pregled taksonomske istorije i rasprostranjenja velikih krestatsih mrmoljaka (*Triturus cristatus* superspecies).

U okviru roda *Triturus* ranije su se nalazile vrste koje se danas svrstavaju u više odvojenih rodova. Rod *Triturus* je u odnosu na veličinu tela tradicionalno bio podeljen na tri grupe:

- 1) veliki mrmoljci – oko 16 cm ukupne dužine koja obuhvata vrste mrmoljaka koje danas čine rod *Triturus*,
- 2) mrmoljci srednje veličine – 12 cm, vrsta *Ichthyosaura alpestris*,
- 3) mali mrmoljci – oko 8 cm, vrste roda *Lissotriton*.

Bolkaj (Bolkay 1928) na osnovu karakteristika lobanje predlaže klasifikaciju familije Salamandridae i deli monofiletski rod *Triturus* u tri grupe: Palaeotriton, Mesotriton i Neotriton (gde pripadaju današnji predstavnici roda *Triturus*). Vejk i Ozeti (Wake i Özeti 1969) ispituju evolucione odnose u okviru familije Salamandridae na osnovu 40 karaktera, od kojih je 27 vezano za mehanizme ishrane, i takođe zaključuju monofiletsko poreklo tadašnjeg roda *Triturus*. Do istog zaključka dolazi i Halidej (Halliday 1977) na osnovu ponašanja tokom reprodukcije, odnosno izostanka ampleksusa i karakterističnog „udvaranja“. Daljim istraživanjima, pre svega alozima, mikrosatelita i mtDNK, pobijena je teza o monofiliji roda (npr. Rafinski i Arntzen 1987; Titus i Larson 1995; Zajc i Arntzen 1999; Weisrock i sar. 2006; Steinfartz i sar. 2007; Zhang i sar. 2008; Wiens i sar. 2011). Garsija-Paris i saradnici (García-París i sar. 2004) predlažu odvajanje malih mrmoljaka u rod *Lissotriton* i vrste *Ichthyosaura alpestris* u rod *Mesotriton*, dok Litvinčuk i saradnici (Litvinchuck i sar. 2005) dodatno odvajaju vrstu *T. vittatus* u rod *Ommatotriton*.

Volterštrof (Wolterstorff 1923) opisuje četiri podvrste vrste *T. cristatus* na osnovu morfoloških razlika (Wolterstroff-Index predstavlja dužinu prednjih ekstremiteta podeljenu sa rastojanjem između ekstremiteta): *T. c. cristatus* – sa najsevernijim rasprostranjenjem,

*T. c. carnifex* – južno od Alpa i u Italiji i istočno do Dinarskih Alpa, *T. c. dobrogicus* – dolina Dunava od Beča do Crnog mora i *T. c. karelinii* – od Balkanskog poluostrva do Kaspijskog mora (Wallis i Arntzen 1989). Ovakva klasifikacija podržana je geografski koherentnim obrascem distribucije – jedan takson na severnom Palearktiku, jedan na Apeninskom poluostrvu i severnom Balkanu i jedan na južnom Balkanu uključujući istočno Krim, Kavkaz i južne obale Kaspijskog mora (Arntzen i Wielstra 2010).

Na osnovu komparativne analize specifičnih genomskih karaktera i rezultata citogenetičkih studija interspecijskih hibrida četiri podvrste vrste *T. cristatus* podignute su na nivo vrsta: *T. cristatus* (Laurenti 1768), *T. dobrogicus* (Kiritzescu 1903), *T. carnifex* (Laurenti 1768) i *T. karelinii* (Strauch 1870) (Bucci – Innocenti i sar. 1983).

Vrsta *T. cristatus* ima najšire i najsevernije rasprostranjenje od svih vrsta velikih mrmoljaka – od Velike Britanije, centralne Švedske i Norveške na severu, centralne Rusije i Urala na istoku, do obala Atlantika u Francuskoj na zapadu i zapadne Rumunije na jugu (Horák 2007). Populacije vrste *T. cristatus* imaju malu genetičku varijabilnost prema alozimskim i mtDNK podacima (Wallis i Arntzen 1989; Steinfartz i sar. 2007). Morfološke razlike nisu opisane (Horák 2007).

*Triturus carnifex* naseljava Apeninsko i Balkansko poluostrvo sa proširenjem areala u centralnu Evropu do južnih delova Češke (Arntzen 2003). Na osnovu morfoloških i genetičkih istraživanja (Crnobrnja i sar. 1989; Kalezić i sar. 1997; Arntzen i Wallis 1999; Arntzen 2003; Horák 2007) prepoznate su dve podvrste: *T. c. carnifex* (Apeninsko poluostrvo i severno-istočni deo Balkana) i *T. c. macedonicus* (zapadna Albanija i Grčka do centralne Srbije i Makedonije na istoku). Podvrste su počele da divergiraju odavno, verovatno nastankom Jadranskog mora (Arntzen i sar. 2007).

Arncen i Volis (Arntzen i Wallis 1999) klasifikuju vrstu originalno opisanu kao *Molge karelinii* var. *Macedonica* (Karaman 1922) kao podvrstu *T. c. macedonicus* sa distribucijom na Balkanu, južno i istočno od Bosne i Hercegovine. Na osnovu broja trupnih pršljenova, mtDNA RFLP analize (Arntzen i Wallis 1999) i visokog nivoa genetičke diferencijacije između podvrsta, zatim morfoloških razlika u obojenosti i obrascu mrlja, kao i starosti veće od

5 miliona godina, Arncen i saradnici (Arntzen i sar. 2007) podižu podvrstu *T. c. macedonicus* na nivo vrste *T. macedonicus*.

Rasprostranjenje vrste *T. dobrogicus* je ograničeno basenom srednjeg i donjeg toka Dunava, severno do južno-istočnih delova Češke i južno do severnih delova Bugarske (Horák 2007) i podeljeno je na dva dela. Podaci dobijeni elektroforezom (Litvinchuk i sar. 1994) i ispitivanjem mtDNK (Arntzen i Wallis 1999) pokazuju veliku sličnost među regionima i ne podržavaju odvajanje podvrsta. Ipak, Litvinčuk i Borkin (Litvinchuk i Borkin 2000) na osnovu morfoloških razlika (morfometrije, broja trupnih pršljenova, obojenosti i obrasca mrlja na abdomenu) predlažu dve podvrste *T. d. macrosomus* (naseljava Panonski basen) i *T. d. dobrogicus* (naseljava Dobrudžu). Voroš i Arcen (Vörös i Arntzen 2010) na osnovu visoke varijabilnosti alozima i protoka gena među populacijama, ponovo dovode u pitanje postojanje podvrsta. Wielstra i saradnici (Wielstra i sar. 2016) sprovode filogeografsko istraživanje pomoću novih jedarnih markera. Dobijeni podaci ukazuju na intraspecijske varijacije u Panonskom basenu, ali sa obilnim protokom gena. Podaci dobijeni ispitivanjem mtDNK ukazuju na nedostatak geografske struktuiranosti vrste. Zaključuju da dobijeni rezultati ne pružaju dokaz o postojanju dve podvrste i preporučuju da se *T. dobrogicus* posmatra kao monotipska vrsta (Wielstra i sar. 2016).

Rasprostranjenje mrmoljaka ranije smatranih vrstom *T. karelinii* obuhvata Balkansko poluostrvo (izolovane enklave u Srbiji i Trakiji), Anatoliju, Kavkaz, Krim i južne obale Kaspijskog mora (Wielstra i sar. 2010). Genetičku varijabilnost u okviru *T. karelinii* grupe, prvi su uočili Volis i Arncen (Wallis i Arntzen 1989) ispitivanjem mtDNK. Litvinčuk i saradnici (Litvinchuk i sar. 1999) na osnovu veličine genoma, varijacije proteina i morfoloških karakteristika, zaključuju da se populacije *T. karelinii* u Srbiji razlikuju od drugih populacija, odnosno da balkanski mrmoljci pripadaju novoj podvrsti *T. k. arntzeni*. Potvrđeno je i parafiletičko grupisanje u okviru *T. karelinii* grupe (Steinfartz i sar. 2007). Pomoću podataka dobijenih obradom sekvenci mitohondrijske i jedarne DNK, podvrste *T. k. karelinii* i *T. k. arntzeni* podignute su na nivo vrsta – istočnu *T. karelinii* (Strauch 1870) i zapadnu *T. arntzeni* (Litvinchuk, Borkin, Džukić i Kalezić 1999), uz objašnjenje da su taksoni genetički razdvojeni na istom ili dubljem nivou od ostalih vrsta roda *Triturus* i da su imali dugačku nezavisnu evolucionu istoriju jer je vreme njihovog porekla blisko bazalnoj radijaciji

grupe velikih mrmoljaka (Themudo i sar. 2009). Arncen i Vielstra (Arntzen i Wielstra 2010) elektroforetski analiziraju 40 jedarnih lokusa da bi istražili gde je i kako locirana kontaktna zona *T. arntzeni* – *T. karelinii*. Zaključili su da postoje zapadna i istočna grupa koje odgovaraju vrstama *T. arntzeni* i *T. karelinii*, a da se granica među vrstama prostire u zapadnoj Anatoliji, a ne u Trakiji kako je prvobitno smatrano.

Vielstra i saradnici (Wielstra i sar. 2010) sprovode opsežno filogeografsko istraživanje zasnovano na podacima dobijenim sekvenciranjem mtDNK. Zaključuju da *T. karelinii* grupa ima monofiletsko poreklo i da se sastoji iz tri geografski koherentne klade: istočne (Kavkaz, Krim i južne obale Kaspijskog mora), centralne (severna Turska i južna obala Crnog mora) i zapadne (zapadna Turska – azijski deo i Balkansko poluostrvo). U daljem istraživanju (Wielstra i Arntzen 2012) uključuju i metode prostorne ekologije. Kvantifikuju razlike u ekološkim nišama među vrstama velikih mrmoljaka uključujući i kandidate za vrste (tri filogenetske linije *T. karelinii* grupe). Sve vrste naseljavaju znatno različite segmente životne sredine. Vrednosti preklapanja niša za tri linije nemaju značajne razlike od onih za priznate vrste. Na osnovu dobijenih rezultata, kao i mtDNK genetičke divergencije, zaključuju da tri filogenetske linije *T. karelinii* zapravo predstavljaju kriptične vrste. Iako postoji genetička diferencijacija među tri filogenetske linije, nisu postojale utvrđene morfološke razlike (npr. broj trupnih pršljenova iznosi 13 za sve tri linije) što može da ukazuje da postoji veoma složena intraspecijska varijacija mtDNK ili da tri linije zapravo predstavljaju morfološki kriptične vrste. Istraživanjem veličine i oblika lobanje (Ivanović i sar. 2013) dobijen je veoma kompleksan obrazac varijabilnosti. Zaključeno je da postoji značajna razlika u obliku lobanje između mtDNK linija sa velikom varijabilnošću unutar linija i bez jasnog preklapanja u obrascima morfološke i genetičke varijabilnosti. Multilokusnim pristupom (sekvenciranjem tri jedarna introna i jednog mtDNK gena), došlo se do zaključka da tri mtDNK linije predstavljaju i odvojene fondove jedarnih DNK gena (Wielstra i sar. 2013a). Neslaganje je pronađeno na severozapadu azijskog dela Turske, gde je nekoliko populacija identifikovano kao centralni *T. karelinii* na osnovu jedarne DNK, ali sa mtDNK zapadnog *T. karelinii*. Ovaj fenomen objašnjen je asimetričnom mtDNK introgresijom koja je podržana biogeografskim scenarijom. Smatra se da tri filogenetske linije *T. karelinii* treba posmatrati kao odvojene vrste. Takođe, zaključeno je da, iako je ime *T. arntzeni* dodeljeno zapadnom *T. karelinii*,



mrmoljci sa tipičnog lokaliteta Vrtovac zapravo pripadaju vrsti *T. macedonicus* – prema veličini genoma i obrascu mrlja na vratu i abdomenu. Predlažu da se ime *T. arntzeni* posmatra kao sinonim *T. macedonicus* i da se ne koristiti kao ime zapadnog *T. karelinii*. Pomoću sekvenciranja nove generacije i 52 jedarna markera (Wielstra i Arntzen 2014), zaključeno je da je većina alela vrste sa lokaliteta Vrtovac pripada *T. macedonicus*, ali uz znatno prisustvo alela *T. ivanbureschi*, kao i alela *T. cristatus* i *T. dobrogicus* u niskim frekvencijama. Populacije na lokalitetu Vrtovac, prethodno smatrane za *T. arntzeni*, predstavljaju genetički izmešanu hibridinu populaciju *T. macedonicus*-*T. ivanbureschi* nastalu dugogodišnjim unakrsnim ukrštanjem sa roditeljskim vrstama. Zbog hibridizacije, ime *T. arntzeni* može se smatrati i sinonimom za vrstu *T. ivanbureschi*, pored već predloženog sinonima za *T. macedonicus*. Kao ime zapadnog i centralnog *T. karelinii* i kao novu vrstu, Vielstra i saradnici (Wielstra i sar. 2013b) predlažu *T. ivanbureschi* sa rasprostranjenjem na jugoistočnom delu Balkanskog poluostrva (Bugarska, istočni delovi Grčke, Makedonija, Srbija), evropskom delu Turske i azijskom delu Turske (uz obalu Egejskog, Mramornog i Crnog mora). U Srbiji je potvrđena izolovana enklava formirana širenjem *T. cristatus* na severu i *T. macedonicus* na jugu (Wielstra i Arntzen 2012; Wielstra i sar. 2017). Vielstra i Arncen (Wielstra i Arntzen 2014) utvrđuju da se mtDNK *T. ivanbureschi* širi van granica određenih jedarnom DNK, zapadno u južnoj Srbiji u opseg *T. macedonicus* i istočno u severozapadnom azijskom delu Turske u opseg *T. anatolicus*. Primenom 52 nuklarna markera i sekvenciranjem nove generacije, utvrđeno je i da se vrsta *T. ivanbureschi* sastoji iz dva odvojena genska fonda. Vielstra i Arncen (Wielstra i Arntzen 2016) zaključuju da bi ovaj takson trebalo tretirati kao dve odvojene, morfološki kriptične vrste: zapadnu *T. ivanbureschi* (jugoistočno Balkansko poluostrvo) i istočnu, novu vrstu, *T. anatolicus* (severni azijski deo Turske).

### **Literatura:**

Arntzen, J.W. 2003. *Triturus cristatus* Superspecies – Kammolch – Artenkreis (*Triturus cristatus* (Laurenti, 1768) – Nördlicher Kammolch, *Triturus carnifex* (Laurenti, 1768) – Italienischer Kammolch, *Triturus dobrogicus* (Kiritzescu, 1903) – Donau–Kammolch, *Triturus karelinii* (Strauch, 1870) – Südlicher Kammolch). Handbuch der

- Reptilien und Amphibien Europas. Schwanzlurche IIA. Aula–Verlag, Wiebelsheim, DE.
- Arntzen, J.W., Wallis, G.P. 1999. Geographic variation and taxonomy of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies): morphological and mitochondrial DNA data. *Contributions to Zoology*, **63**:181–203.
- Arntzen, J.W., Wielstra, B. 2010. Where to draw the line? A nuclear genetic perspective on proposed range boundaries of the crested newts *Triturus karelinii* and *T. arntzeni*. *Amphibia-Reptilia*, **31**:311–322.
- Arntzen, J.W., Themudo, G.E., Wielstra, B. 2007. The phylogeny of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies) nuclear and mitochondrial genetic characters suggest a hard polytomy, in line with the paleogeography of the centre of origin. *Contributions to Zoology*, **76**:261–278.
- Bolkay, J. 1928. Die Schädel der Salamandrinen, mit besonderer Rücksicht auf ihre systematische Bedeutung. *Anatomy and Embryology*, **86**:259–319.
- Bucci-Innocenti, S., Ragghianti, M., Mancino, G. 1983. Investigations of karyology and hybrids in *Triturus boscai* and *T. vittatus*, with a reinterpretation of the species groups within *Triturus* (Caudata: Salamandridae). *Copeia*, 662–672.
- Crnobrnja, J., Kalezić, M.L., Džukić, G. 1989. Genetic divergence in the crested newt (*Triturus cristatus* complex) from Yugoslavia. *Biosistematika*, **15**:81–92.
- García-París, M., Montori, A., Herrero, P. 2004. Fauna ibérica: Amphibia: Lissamphibia (Vol. 24). Editorial CSIC-CSIC Press, Madrid, ES.
- Halliday, T. R. 1977. The courtship of European newts: an evolutionary perspective. The reproductive biology of amphibians. Springer, US.
- Horák, A. 2007. Genetic structure of *Triturus cristatus* complex in central Europe. Ph.D. Thesis [in English] – Department of Zoology, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Ivanović, A., Üzümlü, N., Wielstra, B., Olgun, K., Litvinchuk, S.N., Kalezić, M.L., Arntzen, J.W. 2013. Is mitochondrial DNA divergence of Near Eastern crested newts (*Triturus*

- karelinii* group) reflected by differentiation of skull shape?. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, **252**:269–277.
- Kalezić, M.L., Džukić, G., Mesaroš, G., Crnobrnja-Isailović, J. 1997. The crested newt (*Triturus cristatus* superspecies) in ex-Yugoslavia: morphological structuring and distribution patterns. *University Thoughts Natural Science Priština*, **4**:39–46.
- Litvinchuk, S.N., Borkin, L.J. 2000. Intraspecific taxonomy and nomenclature of the Danube crested newt, *Triturus dobrogicus*. *Amphibia-Reptilia*, **21**:419–430.
- Litvinchuk, S., Sokolova, T.M., & Borkin, L.J. 1994. Biochemical differentiation of the crested newt (*Triturus cristatus* group) in the territory of the former USSR. *Abhandlungen und Berichte für Naturkunde Magdeburg*, **17**:67–74.
- Litvinchuk, S.N., Borkin, L.J., Džukić, G., Kalezić, M.L., Khalturin, M.D., Rosanov, J.M. 1999. Taxonomic status of *Triturus karelinii* on the Balkans, with some comments about other crested newt taxa. *Russian Journal of Herpetology*, **6**:153–163.
- Litvinchuk, S.N., Zuiderwijk, A., Borkin, L.J., Rosanov, J.M. 2005. Taxonomic status of *Triturus vittatus* (Amphibia: Salamandridae) in western Turkey: trunk vertebrae count, genome size and allozyme data. *Amphibia-Reptilia*, **26**:305–324.
- Rafiński, J., Arntzen, J.W. 1987. Biochemical systematics of the Old World newts, genus *Triturus*: allozyme data. *Herpetologica*, **43**:446–457.
- Steinfartz, S., Vicario, S., Arntzen, J.W., Caccone, A. 2007. A Bayesian approach on molecules and behavior: reconsidering phylogenetic and evolutionary patterns of the Salamandridae with emphasis on *Triturus* newts. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, **308**:139–162.
- Themudo, G.E., Wielstra, B., Arntzen, J.W. 2009. Multiple nuclear and mitochondrial genes resolve the branching order of a rapid radiation of crested newts (*Triturus*, Salamandridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52**:321–328.
- Titus, T.A., Larson, A. 1995. A molecular phylogenetic perspective on the evolutionary radiation of the salamander family Salamandridae. *Systematic Biology*, **44**:125–151.
- Vörös, J., Arntzen, J.W. 2010. Weak population structuring in the Danube crested newt, *Triturus dobrogicus*, inferred from allozymes. *Amphibia-Reptilia*, **31**:339–346.

- Wake, D.B., Özeti, N. 1969. Evolutionary relationships in the family Salamandridae. *Copeia*, 124–137.
- Wallis, G.P., Arntzen, J.W. 1989. Mitochondrial DNA variation in the crested newt superspecies: limited cytoplasmic gene flow among species. *Evolution*, **43**:88–104.
- Weisrock, D.W., Papenfuss, T.J., Macey, J.R., Litvinchuk, S.N., Polymeni, R., Ugurtas, I.H., & Larson, A. 2006. A molecular assessment of phylogenetic relationships and lineage accumulation rates within the family Salamandridae (Amphibia, Caudata). *Molecular phylogenetics and evolution*, **41**:368–383.
- Wielstra, B., Arntzen J.W. 2012. Postglacial species displacement in *Triturus* newts deduced from asymmetrically introgressed mitochondrial DNA and ecological niche models. *BMC Evolutionary Biology*, **12**:161.
- Wielstra, B., Arntzen, J.W. 2014. Kicking *Triturus arntzeni* when it's down: large-scale nuclear genetic data confirm that newts from the type locality are genetically admixed. *Zootaxa*, **3802**:381–388.
- Wielstra, B., Arntzen, J.W. 2016. Description of a new species of crested newt, previously subsumed in *Triturus ivanbureschi* (Amphibia: Caudata: Salamandridae). *Zootaxa*, **4109**:73–80.
- Wielstra, B., Themudo, G.E., Güclü, Ö., Olgun, K., Poyarkov, N.A., Arntzen, J.W. 2010. Cryptic crested newt diversity at the Eurasian transition: the mitochondrial DNA phylogeography of Near Eastern *Triturus* newts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **56**:888–896.
- Wielstra, B., Baird, A.B., Arntzen, J.W. 2013a. A multimarker phylogeography of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies) reveals cryptic species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **67**:167–175.
- Wielstra, B., Litvinchuk, S.N., Naumov, B., Tzankov, N., Arntzen, J.W. 2013b. A revised taxonomy of crested newts in the *Triturus karelinii* group (Amphibia: Caudata: Salamandridae), with the description of a new species. *Zootaxa*, **3682**:441–453.
- Wielstra, B., Vörös, J., Arntzen, J.W. 2016. Is the Danube crested newt *Triturus dobrogicus* polytypic? A review and new nuclear DNA data. *Amphibia-Reptilia*, **37**:167–177.

- Wielstra, B., Burke, T., Butlin, R.K., Arntzen, J.W. 2017. A signature of dynamic biogeography: enclaves indicate past species replacement. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **284**:20172014.
- Wiens, J.J., Sparreboom, M., Arntzen, J.W. 2011. Crest evolution in newts: implications for reconstruction methods, sexual selection, phenotypic plasticity and the origin of novelties. *Journal of Evolutionary Biology*, **24**:2073–2086.
- Wolterstorff, W. 1923. Übersicht den Unterarten und Formen des *Triton cristatus* Laur. Blätter für Aquarien- und Terrarien-kunde. **34**:120–126.
- Zajc, I., Arntzen, J.W. 1999. Phylogenetic relationships of the European newts (genus *Triturus*) tested with mitochondrial DNA sequence data. *Contributions to Zoology*, **68**:73–82.
- Zhang, P., Papenfuss, T.J., Wake, M.H., Qu, L., Wake, D.B. 2008. Phylogeny and biogeography of the family Salamandridae (Amphibia: Caudata) inferred from complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **49**:586–597.

**Prilog 2.** Pregled biogeografske istorije velikih krestastih mrmoljaka (*Triturus cristatus* superspecies).

Biogeografija objašnjava prostorno-vremensku distribuciju biodiverziteta koja je oblikovana mrežom različitih faktora. Kombinacijom dva biogeografska pristupa, ekološkog i istorijskog, odnosno aktivnog i pasivnog, moguće je shvatiti kompleksnu sliku današnjeg rasprostranjenja. Ispitivanjem prostorne distribucije filogenetskih linija formulišu se biogeografske hipoteze. Tema filogeografskih istraživanja je distribucija intraspecijskih genetičkih diferencijacija. Današnja genetička struktura vrste je rezultat njene evolucione istorije (Avice 2004). Ledena doba povezana su sa velikim klimatskim oscilacijama koje imaju glavni uticaj na obrasce distribucije vrsta. Dugi, hladni i suvi glacijalni ciklusi smenjuju se sa relativno kratkim, toplim i vlažnim interglacijalima. Vrste preživljavaju u refugijumima tokom glacijalnih perioda, da bi tokom interglacijala ponovo rekolonizovale prethodne areale (Hewitt 2000).

Rasprostranjenje vodozemaca je usko povezano sa uslovima životne sredine tako da velike klimatske promene dovode do značajnih promena areala. Areal roda *Triturus* (veći deo Evrope i susedne Azije) odlikuje se dinamičnom geomorfološkom i klimatološkom istorijom koja u kombinaciji sa ekološkim faktorima daje sliku evolucione istorije kroz prostor i vreme (Wielstra 2012). Balkansko poluostrvo, gde se susreću četiri vrste velikih mrmoljaka (*T. cristatus*, *T. macedonicus*, *T. ivanbureschi* i *T. dobrogicus*), smatra se centrom porekla diverziteta velikih mrmoljaka (Crnobrnja–Isailović i sar. 1997). Mrmoljci nasaljevaju regione koji su važni glacijalni refugijumi (Iberijsko, Apeninsko i Balkansko poluostrvo, Anatolija, Kavkaz i južne obale Kaspijskog mora), kao i delove koji su bili nenaseljivi tokom glacijalnih perioda (npr. umereni deo Evroazije) (Wielstra i sar. 2013).

Istraživanjem pomoću alozima i mtDNK potvrđena je monofilija roda, kao i grupa unutar roda (mramorastih i krestaststih velikih mrmoljaka). Arncen i saradnici (Arntzen i sar. 2007) postavljaju hipotezu da je nemogućnost razrešenja filogenetskih odnosa velikih mrmoljaka posledica politomije – simultanog vremenskog i prostornog porekla vrsta i procenjuju radijaciju pretka velikih mrmoljaka u četiri linije prema dva biogeografska scenarija. Prema prvom scenariju, zasnovanom na alozimskim podacima, postojao je jedan

centar porekla velikih mrmoljaka blizu Sofije u Bugarskoj odakle su nastale četiri linije: istočna od koje nastaje *T. dobrogicus*, južna od koje nastaje *T. karelinii*, zapadna koja se širi preko Dinarida i formira *T. carnifex* i severna koja se širi preko Karpata i daje *T. cristatus*. Prema drugom verovatnijem scenariju, zasnovanom na mtDNK molekulskom satu, predak velikih mrmoljaka naseljavao je centralni deo Balkanskog poluostrva u srednjem Miocenu. Pre 14 do 13 miliona godina Turska i Evropa su bile povezane, oko Panonskog basena postojala je kontinuirana kopnena masa a Dobrudža nije bila ostrvo. Nakon dva miliona godina, Dobrudža je izolavana i sa njom linija koja će dati *T. dobrogicus*. Karpati se odvajaju od Dinarida i Rodopa na mestu današnje Đerdapske klisure, što dovodi do odvajanja linija koje će dati *T. cristatus* i *T. carnifex*. Moreuz razdvaja Evropu i Aziju kao i liniju koja će dati *T. karelinii*. Pre 8,5 do 7 miliona godina, Dobrudža je ponovo povezana sa kontinentom, a moreuzi kod Đerdapa i Istanbula bivaju zatvoreni, što četiri vrste dovodi ponovno u kontakt. Po ovom scenariju, radijacija velikih mrmoljaka desila se pre oko 13,5 miliona godina po paleografskim podacima ili pre oko 11 miliona godina po molekularnim podacima. Takođe po ovom scenariju četiri linije su bile odvojene tokom dugačkog vremenskog perioda što je omogućilo nastanak nezavisnih evolucionih puteva i sticanje visokog stepena reproduktivne izolacije (Arntzen i sar. 2007).

Istraživanjem odnosa između morfološke i ekološke i razrešenijim filogenetskim stablom dobijenim sekvenciranjem mtDNK genoma, ustanovljeno je drugačije vreme razdvajanja i utvrđeno je da politomija nije “teška” kako je prvobitno smatrano (Wielstra i Arntzen 2011). Odvajanje *T. karelinii* grupe od ostalih vrsta velikih mrmoljaka desilo se pre oko 10,4 miliona godina, čemu je prethodio nastanak Egejskog mora koje je razdvojilo Balkansko poluostrvo od Anatolije (pre oko 12 do 9 miliona godina). Ne postoji jasno objašnjenje geografskih događaja koji su prethodili odvajanjima koja su dala preostale tri eko-morfološke grupe, odvajanje *T. carnifex* – *T. macedonicus* od *T. cristatus* i *T. dobrogicus* (pre oko 9,3 miliona godina) i odvajanje *T. cristatus* i *T. dobrogicus* (pre oko 8,8 miliona godina). Pošto ne postoje opsežne filogeografske rekonstrukcije Balkanskog poluostrva za period između 11 i 8,5 miliona godina, moguće je da još uvek nisu otkriveni događaji koji su doveli do ovih razdvajanja. Vremenski okvir radijacije velikih mrmoljaka odgovara periodu povećanih sezonskih razlika u Evroaziji tokom kasnog Miocena (11,6 do 5,3 miliona godina)

koje je povezano sa uzdizanjem Tibetanskog platoa. S obzirom da različite morfološke grupe velikih mrmoljaka pokazuju ekološke razlike u vremenu koje godišnje provode u vodi, moguće je postavljanje alternativne hipoteze koja bi objasnila šta se dogodilo u periodu za koji ne postoje jasni geografski preduslovi. Prema toj hipotezi, razlike u obliku tela velikih mrmoljaka odražavaju rapidnu adaptivnu radijaciju u odnosu na različite vodne režime. Ove dve hipoteze, istorijska i ekološka, ne moraju da isključuju jedna drugu (Wielstra i Arntzen 2011).

Opsežno filogeografsko istraživanje na osnovu podataka dobijenih analizom mtDNK omogućilo je određivanje geografske genetičke struktuiranosti za sve vrste roda *Triturus* (Wielstra i sar. 2013). Korišćenjem modela rasprostranjenja utvrđeno je rasprostranjenje vrsta tokom poslednjeg glacijalnog maksimuma. Kombinacijom filogeografije i modelovanja rasprostranjenja moguće je locirati glacijalne refugijume, odnosno moguće je otkriti genetički bogatije regione koji odražavaju dugotrajnu naseljenost i genetički siromašnije regione koji su tek skorije postali naseljivi. Mrmoljci su tokom ledenog doba naseljavali i Anatoliju, južni basen Kaspijskog mora i zapadnu Gruziju, pored Iberijskog, Apeninskog i Balkanskog poluostrva. Vrste roda *Triturus* pokazuju prostornu varijabilnost u genetičkoj kompoziciji populacija, što može biti rezultat dva procesa – dugotrajnog *in situ* prisustva i sekundarnog kontakta razdvojenih populacija. Rod se odlikuje parapatričkom distribucijom vrsta koja se međusobno geografski isključuju što ukazuje da su različite vrste ekološki previše slične da bi mogle da koegzistiraju. Trenutne kontaktne zone rezultat su sekundarnog kontakta – tokom glacijala areali vrsta su bili ograničeni da bi se ponovo proširili tokom interglacijala. Međutim, vrste mogu biti blokirane geofizičkim barijerama tokom interglacijalnog širenja i mogu međusobno da isključuju prisustvo blokirajući drugu vrstu pregustom naseljenošću. Asimetrična introgresija mtDNK omogućuje uvid u interspecijske interakcije nakon sekundarnog kontakta. Introgresija je uglavnom ograničena na kontaktne zone kod velikih mrmoljaka, osim u slučajevima *T. marmoratus* – *T. pygmaeus* i *T. ivanbureschi* – *T. macedonicus* gde se introgresija javlja na velikom prostoru i ukazuje na interspecijsku kompeticiju u prošlosti (Wielstra i sar. 2013).

Nedostatak varijabilnosti mtDNK ukazuje da je veliki deo današnjih *T. cristatus* populacija potekao iz samo nekoliko ili čak jednog refugijalnog centra koji se verovatno



nalazio najsevernije od svih vrsta velikih mrmoljaka. U refugijumima su populacije verovatno masovno prolazile efekat uskog grla. Nekoliko haplotipova pronađenih u centralnoj Evropi ukazuju da su verovatni refugijumi bili u podnožju Karpata u Rumuniji (Horák 2007). Tokom interglacijala, *T. cristatus* naseljava veliku površinu od zapadne Evrope do centralne Rusije, što ukazuje na brzinu kojom su se širili. Jedino je u Karpatima zabeležena visoka genetička diferencijacija među populacijama inače genetički uniformne vrste. Iako je areal *T. cristatus* proširen južno na račun *T. ivanbureschi*, prisustvo nekoliko relativno starih *T. cristatus* mtDNK linija u Srbiji i Bugarskoj ukazuje na dugotrajno prisustvo južno od Dunava (Wielstra i sar. 2013). *Triturus cristatus* je jedina vrsta velikih mrmoljaka koja je uspela da kolonizuje umerene delove Evroazije nakon poslednje glacijacije. Rezultatima dobijenim kombinacijom multilokusne filogeografije (mitohondrijske i jedarne DNK) i modelovanja distribucije vrsta, utvrđeno je da se tokom glacijalnih ciklusa održalo više različitih geografski razdvojenih populacija u Karpatima (Wielstra i sar. 2015).

Populacije *T. carnifex* razdvojene su na Balkanskom i Apeninskom poluostrvu, što ukazuje na različite evolucione istorije filogenetskih linija koje su se širile iz različitih refugijuma ili su imale različite postglacijalne puteve rekolonizacije (Horák 2007). Na osnovu mtDNK podataka uočeno je da se različiti genski fondovi nalaze sa obe strane Jadranskog mora uz postojanje visokog genetičkog diverziteta u Italiji. Klimatske simulacije podržavaju scenario prema kome *T. carnifex* postglacijalno kolonizuje deo areala istočno i severno od Alpa. Introgresija *T. carnifex* mtDNK u *T. cristatus* u kontaktnim zonama dve vrste ukazuje da su balkanske populacije *T. carnifex* bile uključene u širenje areala. Prisustvo mtDNK *T. dobrogicus* na granici istočnog areala *T. carnifex* je dodatni dokaz ekspanzije *T. carnifex* (Wielstra i sar. 2013). Istraživanjem filogeografije i evolucione istorije *T. carnifex* pomoću filogenetskog pristupa, molekulskog sata i analiza strukture populacije dva fragmenta mtDNK, pronađene su tri glavne mtDNK linije sa parapatričkom distribucijom. Procenjeno vreme divergencije je između kasnog Pliocena i ranog Pleistocena. Jedna linija je bila široko rasprostranjena južno i severno do Apenina i dalje bila geografski strukturirana na pet podlinija tokom srednjeg Miocena. Druga linija je bila rasprostranjena kroz Padsko-venecijansku ravnicu i ne pokazuje jasnu filogeografsku strukturu. Treća linija je primećena u samo dve populacije na prelazu zapadne Hrvatske i Slovenije. Filogeografska struktura, kao i vremena

divergencije različitih linija, ukazuju da su odgovori vrste *T. carnifex* na Pleistocenske promene životne sredine bili veoma raznoliki. Ovi odgovori uključuju višestruke refugijume: na Apeninima, u velikim perikostalnim nizijama i kriptične severne refugijume (Canestrelli i sar. 2012).

Nastankom Jadranskog mora dolazi do odvajanja podvrsta *T. c. carnifex* i *T. c. macedonicus*, odnosno današnjih vrsta *T. carnifex* i *T. macedonicus* (Arntzen i sar. 2007). Zapadni deo trenutnog rasprostranjenja *T. macedonicus* je verovatno bio naseljiv tokom poslednjeg ledenog doba prema klimatskim modelima. Međutim, to ne odgovara u potpunosti podacima dobijenim sekvenciranjem mtDNK koji pokazuju struktuiranost u južnom delu današnjeg rasprostranjenja, uključujući jugoistok ali ne i severozapad. Genetička varijabilnost *T. macedonicus* je najveća u odnosu na ostale vrste velikih mrmoljaka. Odvojena klada javlja se na Krfu koji je bio povezan sa kopnom tokom glacijacija zbog opadanja nivoa mora. U poslednjoj interglacijalnoj rekolonizaciji, *T. macedonicus* širi areal na račun *T. ivanbureschi*, tako da u velikom delu današnjeg areala *T. macedonicus* poseduje *T. ivanbureschi* mtDNK. Modeli distribucije vrsta takođe potvrđuju ovaj scenario (Wielstra i Arntzen 2012; Wielstra i sar. 2017).

Za razliku od ostalih vrsta velikih mrmoljaka kod kojih je areal populacija ograničen slabom pokretljivošću (godišnje širenje od deset metara do jednog kilometra), areal *T. dobrogicus* se širi i pasivno tokom poplava (do nekoliko kilometara godišnje) (Horák 2007). Rasprostranjenje *T. dobrogicus* poklapa se sa plavnim područjima Dunava, Tise, Drave i Save i okruženo je planinama koje naseljavaju druge vrste velikih mrmoljaka *T. cristatus* na Karpatima, *T. ivanbureschi* na Balkanskim planinama, *T. macedonicus* na Dinarskim planinama i *T. carnifex* na Alpima. Parapatrički obrazac distribucije ukazuje da su se vrste međusobno isključivale – *T. dobrogicus* u nizijama nasuprot drugim vrstama na planinama. Do odvajanja *T. dobrogicus* od ostalih vrsta došlo je tokom Miocena (pre 12 do 11 miliona godina) kada se Dobrudža odvojila od kontinenta. Vrsta ponovo dolazi u kontakt sa drugim vrstama kada dolazi do rekonekcije Dobrudže (pre 8,5 do 7 miliona godina). Karpati, Dinaridi, Balkanske planine i Panonski basen formirani su magmatskom aktivnošću od Eocena (pre 55 miliona godina) do ranog Miocena (pre 23 miliona godina). Relativna stabilnost regiona od tada do danas, ukazuje da je nizijsko-planinska dihotomija staništa *T. dobrogicus* u odnosu na

druge vrste starija od radijacije grupe koja se desila pre oko 11 miliona godina. Klimatske promene u poslednjih dva miliona godina morale su da dovedu do periodičnih promena areala vrsta. Pozicije jednog ili više glacijalnih refugijuma nisu poznate za *T. dobrogicus*. Potencijal za panmiksiju u nizijskim sistemima koje naseljava *T. dobrogicus* može biti visok zbog nedostatka barijera i pasivne disperzije. Utvrđeno je postojanje niske genetičke varijabilnosti mtDNK što potvrđuje postojanje kontinuirane panmitičke populacije (Vörös i Arntzen 2010). Vielstra i saradnici (Wielstra i sar. 2013) zaključuju postojanje više refugijuma tokom poslednjeg glacijala na osnovu relativno visokog genetičkog diverziteta. Postojanje veoma niske genetičke diferencijacije mtDNK ukazuje da je došlo do značajne redukcije distribucije *T. dobrogicus*. Veliki broj veoma sličnih, ali većinom nisko frekventnih haplotipova je u saglasnosti sa rapidnom demografskom ekspanzijom populacija koje su prošle kroz efekat uskog grla. Ne postoji genetička divergencija među populacijama Dobrudže i Panonske nizije. Opadanje nivoa Crnog mora tokom glacijala i Holocena, dovodi do povezivanja Dunava i Dnjepra čime je formirana ruta koja je olakšala skorašnji protok gena. Asimetrična introgresija *T. dobrogicus* mtDNK u četiri druge vrste (*T. carnifex*, *T. cristatus*, *T. ivanbureschi* i *T. macedonicus*) ukazuje da su ove vrste „izgurale” *T. dobrogicus* iz dela prethodnog areala (Wielstra i sar. 2013).

Inicijalno razdvajanje pretka *T. karelinii* grupe od ostalih vrsta velikih mrmoljka procenjuje se na oko pre 9 miliona godina. Tokom ranog i srednjeg Miocena (pre oko 23,03 do 11,61 miliona godina), distribucija pretka obuhvatala je kontinuirano Balkansko-anatolijsko kopno. Tokom kasnog srednjeg i ranog kasnog Miocena (pre oko 12 do 9 miliona godina) došlo je do odvajanja Balkanskog poluostrva i Anatolije formiranjem srednje-egejskog rova što dovodi do odvajanja pretka *T. karelinii* grupe. Razdvajanje koje je dovelo do formiranja istočne klade *T. karelinii* grupe (koja će dati *T. karelinii*) desilo se pre oko 7 miliona godina u vreme uzdizanja jermenskog platoa (pre 10 do 5 miliona godina) izazvanog odvajanjem Arabijsko poluostrva i Azije što je dovelo do izolovanja istočne klade na prostor današnjeg Irana. Takva izolacija bila je dodatno omogućena povremenim povezivanjem Mediterana i Paratetisa kroz Tursko-iranski region. Ostatak današnjeg areala *T. karelinii* još uvek nije bio dostupan. Pre nego što je došlo do podele Paratetisa na Crno i Kaspijsko more i konstituisanja kopnenog prolaza do južne Rusije, Kavkaz je bio arhipelag. Pre 5,59 miliona godina dolazi do

tektonski izazvanog zatvaranja koridora i izolovanja Mediterana od Atlantskog okeana. Razdvajanje centralne i zapadne klade desilo se pre oko 5,5 miliona godina što se podudara sa privremenim isušivanjem Mediterana koje je omogućilo kretanje velikih mrmoljaka između Anatolije i Balkanskog poluostrva. Pre 5,33 miliona godina formiranjem Gibraltara dolazi do ponovnog spajanja Atlantika i Mediterana što dovodi do ponovnog punjenja mediteranskog basena preko Egejskog do Crnog mora. Vodeni tok Mediteran – Crno more preseca kontinuiranu distribuciju velikih mrmoljaka na Anatolijsku i Balkansku komponentu koje odgovaraju centralnoj i zapadnoj kladi (Wielstra i sar. 2010). Pretpostavlja se da je glacijalni refugijum zapadne i centralne mtDNK linije bio u krajnjem severozapadu azijskog dela Turske gde je najveći genetički diverzitet, dok se refugijumom istočne linije smatra južni basen Kaspijskog mora i zapadna Gruzija. Balkansko poluostrvo je postalo naseljivo tek posle poslednjeg glacijala. Relativno skoro jedna klada je naselila Kavkaz i Krim iz Kaspijskog dela areala. Ova klada je još uvek relativno odvojena, što ukazuje da se kolonizacija dogodila tokom poslednjeg interglacijala i da je klada istrajala u refugijumu tokom jednog ili nekoliko glacijalnih ciklusa (Wielstra i sar. 2013).

#### ***Literatura:***

- Arntzen, J.W., Themudo, G.E., Wielstra, B. 2007. The phylogeny of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies) nuclear and mitochondrial genetic characters suggest a hard polytomy, in line with the paleogeography of the centre of origin. *Contributions to Zoology*, **76**:261–278.
- Avise, J.C. 2004. Molecular markers, natural history, and evolution. Sinauer, Sunderland, USA.
- Canestrelli, D., Salvi, D., Maura, M., Bologna, M.A., Nascetti, G. 2012. One species, three Pleistocene evolutionary histories: phylogeography of the Italian crested newt, *Triturus carnifex*. *PLoS One*, **7**:e41754.
- Crnobrnja–Isailović, J., Džukić, G., Krstić, N., Kalezić, M.L. 1997. Evolutionary and paleogeographical effects on the distribution of the *Triturus cristatus* superspecies in the central Balkans. *Amphibia–Reptilia*, **18**:321–332.

- Horák, A. 2007. Genetic structure of *Triturus cristatus* complex in central Europe. Ph.D. Thesis [in English] – Department of Zoology, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Hewitt, G., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**:907.
- Vörös, J., Arntzen, J.W. 2010. Weak population structuring in the Danube crested newt, *Triturus dobrogicus*, inferred from allozymes. *Amphibia-Reptilia*, **31**:339–346.
- Wielstra, B. 2012. Tracing *Triturus* through time: phylogeography and spatial ecology. Ph.D. Thesis. University of Twente, Terneuzen, The Netherlands.
- Wielstra, B., Arntzen, J.W. 2011. Unraveling the rapid radiation of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies) using complete mitogenomic sequences. *BMC Evolutionary Biology*, **11**:1.
- Wielstra, B., Arntzen J.W. 2012. Postglacial species displacement in *Triturus* newts deduced from asymmetrically introgressed mitochondrial DNA and ecological niche models. *BMC Evolutionary Biology*, **12**:161.
- Wielstra, B., Themudo, G.E., Güclü, Ö., Olgun, K., Poyarkov, N.A., Arntzen, J.W. 2010. Cryptic crested newt diversity at the Eurasian transition: the mitochondrial DNA phylogeography of Near Eastern *Triturus* newts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **56**:888–896.
- Wielstra, B., Crnobrnja-Isailović, J., Litvinchuk, S.N., Reijnen, B.T., Skidmore, A.K., Sotiropoulos, K., Toxopeus, A.G., Tzankov, N., Vukov, T., Arntzen, J.W. 2013. Tracing glacial refugia of *Triturus* newts based on mitochondrial DNA phylogeography and species distribution modeling. *Frontiers in zoology*, **10**:13.
- Wielstra, B., Babik, W., Arntzen, J.W. 2015. The crested newt *Triturus cristatus* recolonized temperate Eurasia from an extra-Mediterranean glacial refugium. *Biological Journal of the Linnean Society*, **114**:574-587.
- Wielstra, B., Burke, T., Butlin, R.K., Arntzen, J.W. 2017. A signature of dynamic biogeography: enclaves indicate past species replacement. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **284**:20172014.

### Prilog 3. Dozvola Ministarstva energetike, razvoja i zaštite životne sredine za prikupljanje adultnih jedinki *T. ivanbureschi* iz prirodnih populacija.



Република Србија  
МИНИСТАРСТВО ЕНЕРГЕТИКЕ,  
РАЗВОЈА И ЗАШТИТЕ ЖИВОТНЕ СРЕДИНЕ  
Бр/№: 353-01-75/2014-08  
Датум/Date 13.02.2014.године

Универзитет у Београду  
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОШКА ИСТРАЖИВАЊА  
„СНИША СТАНКОВИЋ“  
Ул.Бул.деспота Стефана 142  
Београд

Министарство енергетике, развоја и заштите животне средине, на основу члана 24.став 3. Закона о државној управи («Службени гласник РС», бр.79/05,101/07) на основу члана 78. Закона о заштити природе («Службени гласник РС», број 36/09,88/10 и 91/10), члана 4 и 6 став 2 Правилника о проглашењу и заштити строго заштићених и заштићених дивљих врста биљака, животиња и гљива («Службени гласник РС», број 5/10), а по претходно прибављеном мишљењу Завода за заштиту природе Србије и Покрајинског завода за заштиту природе, издаје

#### ДОЗВОЛУ ЗА САКУПЉАЊЕ СТРОГО ЗАШТИЋЕНИХ И ЗАШТИЋЕНИХ ВРСТА ВОДОЗЕМАЦА И ГМИЗАВАЦА У НАУЧНОИСТРАЖИВАЧКЕ СВРХЕ

Институту за биолошка истраживања "Синиша Станковић" из Београда, одобрава се сакупљање строго заштићених и заштићених врста водоземаца и гмизаваца у научноистраживачке сврхе, за потребе реализације пројекта „*Диверзитет водоземаца и гмизаваца Балканског полуострва: еволуциони аспекти и конзервација*“.

Корисник дозволе дужан је да Министарству, Заводу и Секретаријату надлежном за послове заштите животне средине, достави извештаје пројекта, а да управљаче у заштићеном подручју благовремено обавести о активностима. При кретању кроз режим заштите I степена обавезно је присуство чуварске службе управљача заштићених подручја. Дозвола се издаје за период 2014.године.

#### Образложење

Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић" поднео је захтев за сакупљање узорака популације *Triturus spp.*, *Pelobates syraacus*, *Ablepharus kitaibelii*, *Darevskia praticola*, *Podarcis tauricus*, *Dolichophis caspius*, *Vipera ursinii*, *Bufo bufo*, *Bufo viridis*, *Rana dalmatina*, *Pelophylax esculentus complex*, *Lacerta viridis*, *Podarcis muralis*, *Vipera ammodytes*, *Testudo hermani*, *Testudo graeca*, *Natrix natrix*, *Natrix tessellata*, *Dolichophis caspius*, *Zamenis longissimus*, *Salamandra salamandra*.

ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОШКА ИСТРАЖИВАЊА  
„СНИША СТАНКОВИЋ“  
БЕОГРАД

Примљено: 16.02.2014

Организација	Л.п.	Проект	Д.број
03	30		

Приликом разматрања захтева а на основу мишљења Завода за заштиту природе Србије бр.(03- 020-271) и Покрајинског завода за заштиту природе бр. (03- 145/2), Министарство је оценило да су испуњени услови за сакупљање строго заштићених и заштићених врста водоземаца и гмизаваца, у научноистраживачке сврхе.

Дозвољено је сакупљање врсте *Triturus spp.*, у количини 10 мужјака и 20 гравидних женки на локалитетима: Баната, Јагодине, Кладова, околине Зајечара, Књажевца, околине Власинских планина, Босилеграда, Пештерске висоравни.

Дозвољено је сакупљање ДНК узорака (без жртвовања животиња) врсте *Triturus spp.*, на локалитетима: Крушевца, Чачка, Сокобање и Петровца на Млави, као и сакупљање врсте *Pelobates syraacus*, *Ablepharus kitaibelii*, *Darevskia praticola*, *Podarcis tauricus*, *Dolichophis caspius*, *Vipera ursinii*, на локалитетима: околина Суботнице, Титела, Апатина, Врбаса, Мокрина, Великог Градишта и Голубца као и сакупљање (жртвовање животиња) по 20 мужјака и 20 женки врста *Bufo bufo*, *Bufo viridis*, *Rana dalmatina*, *Pelophylax esculentus complex*, *Lacerta viridis*, на локалитетима Авале и Жагубице и по 60 мужјака и 60 женки врста *Podarcis muralis* на локалитету Авала.

За потребе популационих СМР истраживања, дозвољава се (изловљавање, маркирање и поновно пуштање) наведених врста водоземаца и гмизаваца на локалитетима долина реке Пчиње, околина Ужица, Пријелоља, Панчевачки рит, Авала, Панчевачки рит, СРП „Обедска бара“.

За потребе истраживања репродуктивних карактеристика популација поскока *Vipera ammodytes*, дозвољава се изловљавање 15 гравидних женки на подручјима долине реке Пчиње и Ваљевских планина.

За потребе израде Црвене књиге водоземаца и гмизаваца Србије, дозвољава се узимање доказа примерака присутних врста водоземаца и гмизаваца на подручјима Бачке, Срема, Шумадије, Поморавља, западне, југозападне, источне, југоисточне и јужне Србије.

На територији Војводине дозвољено је сакупљање водоземаца и гмизаваца на локалитетима (Бачка, Банат, Срем, околина Суботнице, Титела, Апатина, Врбаса, Мокрина, Панчевачки рит, СРП „Обедска бара“), након обављених радова и експеримената, потребно је да се ухваћене јединке врате у њихово станиште.

Руководилац пројекта је др Милош Калезић, учесници на пројекту су: Ана Голубовић, Маја Слјепчевић, Марко Анђелков, мр Наташа Томашевић-Коларов, др Соња Ђорђевић, др Александар Урошевић, др Милена Цвијановић, др Тања Вуков, др Ана Ивановић и др Љиљана Томовић.

На основу изложеног одлучено је као у диспозитиву дозволе.

ПОУКА О ПРАВНОМ СРЕДСТВУ: Дозвола је коначна у управном поступку. Против исте се може покренути управни спор пред Управним судом у року од 30 дана од дана његовог уручења.

Достављено:

- подносноцу захтева
- инспекцији
- архиви



## Prilog 4. Dozvola Agencije za zaštitu životne sredine Vlade Crne Gore za prikupljane adultnih jedinki *T. macedonicus* iz prirodnih populacija.

CRNA GORA  
VLADA CRNE GORE  
AGENCIJA ZA ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE  
02 Broj UPI-328/4  
Podgorica, 06.04.2015. godine

ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОШКА Истраживања  
„СИНІША СТАНКОВИЋ“ БЕОГРАД

Priloz	09.4.2015		
Opis		Priloz	Opis
03	94		

Na osnovu člana 84 stav 2 i člana 91 stav 1 Zakona o zaštiti prirode („Sl.list CG“, br.51/08, 21/09, 40/11, 62/13, 06/14) i člana 196 Zakona o opštem upravnom postupku („Sl.list RCG“, br. 60/03, „Sl.list CG“, br. 32/11), a rješavajući po zahtjevu Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd broj: 02-UPI-328/1 od 11.03.2015. godine, Agencija za zaštitu životne sredine **donosi**

### RJEŠENJE

**I DOZVOLJAVA SE** Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ iz Beograda izvoz i korišćenje u vidu sakupljanje 6 adultnih ženki i 6 adultnih mužjaka vrste *Triturus macedonicus* za potrebe laboratorijskih istraživanja.

Sakupljanje jedinki navedene vrste će se vršiti na lokalitetima lokva Pijavica (Ceklin) i lokva Rid (Meterizi) u periodu do 30.04.2015. godine.

II Izvoz životinjskog materijala će se vršiti na graničnom prelazu Dobrakovo.

III Podnosilac zahtjeva je dužan da nakon završetka istraživanja dostavi podatke o rezultatima istraživanja ovoj Agenciji.

### Obrazloženje

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ iz Beograda je podnio ovom organu zahtjev (br.02-UPI-328/1 od 11.03.2015. godine) za izdavanje dozvole sakupljanje i izvoz jedinki vrste mrmoljka *Triturus macedonicus*. U zahtjevu su vremenski period kada bi se istraživanje vršilo, način transporta i ostali podaci koji su potrebni za dalje postupanje.

Postupajući po predmetnom zahtjevu unutar Agencije za zaštitu životne sredine je 20.03.2015. godine putem dopisa (br. 02-UPI-328/2) traženo stručno mišljenje Sektora za zaštitu prirode, monitoring, analizu i izvještavanje. U pomenutom stručnom mišljenju (01-UPI-328/3 od 27.03.2015. godine) je navedeno da izlov vrste *Triturus macedonicus* na način kako je navedeno u Zahtjevu neće ugroziti opstanak vrste, niti se negativno odraziti na brojnost populacija, uz napomenu da je predmetna vrsta zaštićena Rješenjem o stavljanju pod zaštitu pojedinih biljnih i životinjskih vrsta („Sl.list RCG“, br. 76/06) i da se strogo vodi

računa o održanju vrste i da se ne ugrozi prirodno stanište, čime su se stekli uslovi za izdavanje dozvole podnosiocu zahtjeva.

Na osnovu izloženog odlučeno je kao u dispozitivu ovog rješenja.

**PRAVNA POUKA:** Protiv ovog rješenja može se izjaviti žalba Ministarstvu održivog razvoja i turizma, u roku od 15 dana od dana dostavljanja rješenja, preko ovog organa.

Rješenje obradila:

Jelena Leković

*Jelena Leković*

Pomoćnik direktora:

Dragan Asanović



Dostavljeno:

- Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Bul. Despota Stefana 142, Beograd
- Uprava za inspekcijske poslove: Ekološka inspekcija
- a/a
- 02



AGENCIJA ZA ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE • Environmental Protection Agency

IV Proleterske 19 • 81000 Podgorica • Crna Gora • Tel: +382 20 618 400 • Fax: +382 20 618 371  
epamontenegro@gmail.com • www.epa.org.me



AGENCIJA ZA ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE • Environmental Protection Agency

IV Proleterske 19 • 81000 Podgorica • Crna Gora • Tel: +382 20 618 400 • Fax: +382 20 618 371  
epamontenegro@gmail.com • www.epa.org.me

**Prilog 5.** Mišljenje Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“.



ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОШКА ИСТРАЖИВАЊА  
"СИНИША СТАНКОВИЋ"

Број 01-622

Датум 01.04.2016. год

БЕОГРАД, Бул. деспота Стефана бр.142

Rešenje broj: 03-03/16

## ЕТИЧКА КОМИСИЈА

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Na I redovnoj sednici Etičke komisije IBISS održanoj 30.03.2016. godine, razmatran je zahtev o davanju mišljenja za upotrebu eksperimentalnih životinja vrsta *Triturus ivanbureschi* i *Triturus macedonicus* za potrebe istraživanja pod nazivom „Hibridizacija i stabilnost razvica velikih mrmoljaka“, istraživača Tijane Vučić. Eksperiment će se realizovati u Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković".

Na osnovu sagledavanja prispele dokumentacije i neposrednog uvida u stanje, Etička komisija IBISS smatra da je eksperimentalni protokol u skladu sa propisanim etičkim normama i daje **pozitivno** mišljenje o neophodnosti upotrebe 30 adultnih jedinki vrste *Triturus ivanbureschi* i 12 adultnih jedinki vrste *Triturus macedonicus* u eksperimentu koji će se realizovati u periodu od marta 2016. Do septembra 2018.

U Beogradu, 01.04.2016.

Predsednik Etičke komisije

*Branko Filipović*  
dr Branko Filipović



**Prilog 6.** Pregled uzorka i podaci o jedinkama korišćenim za analize oblika glavenog skeleta i stabilnosti razvića velikih mrmoljaka. Skraćenice: NATURALIS – Holandski nacionalni centar za proučavanje biodiverziteta, Lajden, Holandija; IBISS – Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu, Srbija; Ž – ženka; M – mužjak; na – nepoznat pol.

ID	Vrsta	Zbirka	Broj	Populacija	Pol
crist_13a_netlim_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	9313_a	Holandija: Limburg, Wijnantsrade	Ž
crist_13b_netlim_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	9313_b	Holandija: Limburg, Wijnantsrade	Ž
crist_13c_netlim_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	9313_c	Holandija: Limburg, Wijnantsrade	Ž
crist_232_ukrkam_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	cr232	Ukrajina: Kamenskoye village	Ž
crist_251_ukrkam_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	cr251	Ukrajina: Kamenskoye village	Ž
crist_267_ukrkam_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	cr267	Ukrajina: Kamenskoye village	Ž
crist_276_polsla_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	cr6276	Poljska: Slaskie, Mogielica	Ž
crist_282_polsla_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	cr6282	Poljska: Slaskie, Mogielica	Ž
crist_284_polsla_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	cr6284	Poljska: Slaskie, Mogielica	Ž
crist_286_polsla_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	cr6286	Poljska: Slaskie, Mogielica	Ž
crist_288_polsla_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	cr6288	Poljska: Slaskie, Mogielica	Ž
crist_304_ukrkam_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	cr304	Ukrajina: Kamenskoye village	Ž
crist_306_ukrkam_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	cr306	Ukrajina: Kamenskoye village	Ž
crist_355_romvif_m	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	ZMA9167_355	Rumunija: Virfuri	M
crist_356_romvif_m	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	ZMA9167_356	Rumunija: Virfuri	M
crist_359_romvif_m	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	ZMA9167_359	Rumunija: Virfuri	M
crist_510_enggad_m	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	9285_10	Engleska, Gaddesby, Leicestershire	M
crist_511_enggad_m	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	9285_11	Engleska, Gaddesby, Leicestershire	M
crist_512_enggad_m	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	9285_12	Engleska, Gaddesby, Leicestershire	M
crist_513_enggad_m	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	9285_13	Engleska, Gaddesby, Leicestershire	M
crist_514_enggad_m	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	9285_14	Engleska, Gaddesby, Leicestershire	M
crist_711_romvif_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	ZMA9167_711	Rumunija: Virfuri	Ž
crist_712_romvif_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	ZMA9167_712	Rumunija: Virfuri	Ž
crist_713_romvif_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	ZMA9167_713	Rumunija: Virfuri	Ž
crist_714_romvif_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	ZMA9167_714	Rumunija: Virfuri	Ž
crist_715_romvif_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	ZMA9167_715	Rumunija: Virfuri	Ž
crist_757_romvif_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	ZMA9167_757	Rumunija: Virfuri	Ž
crist_758_romvif_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	ZMA9167_758	Rumunija: Virfuri	Ž
crist_851_enggad_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	9285_1	Engleska, Gaddesby, Leicestershire	Ž
crist_852_enggad_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	9285_2	Engleska, Gaddesby, Leicestershire	Ž
crist_853_enggad_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	9285_3	Engleska, Gaddesby, Leicestershire	Ž
crist_854_enggad_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	9285_4	Engleska, Gaddesby, Leicestershire	Ž
crist_855_enggad_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	9285_5	Engleska, Gaddesby, Leicestershire	Ž
crist_856_enggad_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	9285_6	Engleska, Gaddesby, Leicestershire	Ž
crist_858_enggad_m	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	9285_8	Engleska, Gaddesby, Leicestershire	M
crist_859_enggad_m	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	9285_9	Engleska, Gaddesby, Leicestershire	M
crist_cr1_ukrkam_f	<i>T. cristatus</i>	NATURALIS	cri1	Ukrajina: Kamenskoye village	Ž
marmo_161_spaalb_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	7614_161	Španija: Prov. Madrid, El Berrueco	M
marmo_162_spaalb_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	7614_162	Španija: Prov. Madrid, El Berrueco	M
marmo_163_spaalb_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	7614_163	Španija: Prov. Madrid, El Berrueco	M
marmo_164_spaalb_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	7614_164	Španija: Prov. Madrid, El Berrueco	M

ID	Vrsta	Zbirka	Broj	Populacija	Pol
marmo_165_spaelb_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	7614_165	Španija: Madrid, Berruenco	Ž
marmo_166_spaelb_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	7614_166	Španija: Madrid, Berruenco	Ž
marmo_167_spaelb_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	7614_167	Španija: Madrid, Berruenco	Ž
marmo_39a_fracon_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA_9339_a	Francuska: Confolens	Ž
marmo_39b_fracon_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA_9339_b	Francuska: Confolens	Ž
marmo_39c_fracon_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA_9339_c	Francuska: Confolens	Ž
marmo_39d_fracon_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA_9339_d	Francuska: Confolens	Ž
marmo_39e_fracon_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA_9339_e	Francuska: Confolens	Ž
marmo_39f_fracon_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA_9339_f	Francuska: Confolens	Ž
marmo_535_fraroc_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9151_535	Francuska: Rochechouart	Ž
marmo_536_fraroc_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9151_536	Francuska: Rochechouart	Ž
marmo_749_porsai_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9377_1749	Portugal: Saide	M
marmo_750_porsai_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9377_1750	Portugal: Saide	Ž
marmo_751_porsai_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9377_1751	Portugal: Saide	M
marmo_752_porsai_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9377_1752	Portugal: Saide	M
marmo_753_porsai_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9377_1753	Portugal: Saide	M
marmo_754_porsai_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9377_1754	Portugal: Saide	Ž
marmo_755_porsai_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9377_1755	Portugal: Saide	Ž
marmo_756_porsai_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9377_1756	Portugal: Saide	M
marmo_757_porsai_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9377_1757	Portugal: Saide	Ž
marmo_758_porsai_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9377_1758	Portugal: Saide	M
marmo_759_porped_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9379_1759	Portugal: Pedra do Altar	Ž
marmo_760_porped_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9379_1760	Portugal: Pedra do Altar	M
marmo_761_porped_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9379_1761	Portugal: Pedra do Altar	Ž
marmo_762_porped_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9379_1762	Portugal: Pedra do Altar	Ž
marmo_763_porped_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9379_1763	Portugal: Pedra do Altar	M
marmo_764_porped_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9379_1764	Portugal: Pedra do Altar	Ž
marmo_765_porped_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9379_1765	Portugal: Pedra do Altar	Ž
marmo_766_porped_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9379_1766	Portugal: Pedra do Altar	M
marmo_767_porped_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	ZMA9379_1767	Portugal: Pedra do Altar	M
marmo_769_porsan_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	9380_1769	Portugal: Santos	Ž
marmo_770_porsan_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	9380_1770	Portugal: Santos	M
marmo_771_porsan_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	9380_1771	Portugal: Santos	Ž
marmo_772_porsan_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	9380_1772	Portugal: Santos	M
marmo_773_porsan_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	9380_1773	Portugal: Santos	Ž
marmo_774_porsan_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	9380_1774	Portugal: Santos	M
marmo_775_porsan_m	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	9380_1775	Portugal: Santos	M
marmo_nol_spaelb_f	<i>T. marmoratus</i>	NATURALIS	7614_not labeled	Španija: Madrid, Berruenco	Ž
crxma_057_framay_m	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_8057	Francuska: Mayenne	M
crxma_140_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	9241_40	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_141_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	9241_41	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_142_framay_m	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	9241_42	Francuska: Mayenne	M
crxma_322_framay_m	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	9322	Francuska: Mayenne	M
crxma_327_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	9058_327	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_328_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	9058_328	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_329_framay_N	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	9058_329	Francuska: Mayenne	na
crxma_331_framay_m	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_8033_1	Francuska: Mayenne	M

ID	Vrsta	Zbirka	Broj	Populacija	Pol
crxma_332_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_8033_2	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_333_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_8033_3	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_333_framay_m	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	9062_333	Francuska: Mayenne	M
crxma_43a_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	9243_a	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_43b_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	9243_b	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_470_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_9063_470	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_525_framay_m	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	7525	Francuska: Mayenne	M
crxma_526_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	7526	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_527_framay_m	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_7527	Francuska: Mayenne	M
crxma_528_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	7528	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_534_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	7534	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_535_framay_m	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	7535	Francuska: Mayenne	M
crxma_536_framay_m	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	7536	Francuska: Mayenne	M
crxma_537_framay_m	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_7537	Francuska: Mayenne	M
crxma_538_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_7538	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_539_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_7539	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_540_framay_m	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	7540	Francuska: Mayenne	M
crxma_542_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_9060_542	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_543_framay_N	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_7543	Francuska: Mayenne	M
crxma_543_framay_m	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	9058_543	Francuska: Mayenne	na
crxma_544_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	9058_544	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_545_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	9058_545	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_548_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_9065_548	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_549_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_9066_549	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_550_framay_N	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	7550	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_550_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	9058_550	Francuska: Mayenne	na
crxma_551_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	9062_551	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_553_framay_m	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	7553	Francuska: Mayenne	M
crxma_598_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	7598	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_607_framay_m	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	7607	Francuska: Mayenne	M
crxma_610_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	7610	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_620_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_7620	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_621_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_7621	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_877_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_9067_877	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_878_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_9067_878	Francuska: Mayenne	Ž
crxma_879_framay_f	<i>T. cri</i> × <i>T. mar</i>	NATURALIS	ZMA_9067_879	Francuska: Mayenne	Ž
ivanb_120_turcay_f	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	7564_120	Turska: Caycuma an Bartin	Ž
ivanb_200_bulost_m	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	RMNH_RENA_47200	Bugarska: Ostar Kamak	M
ivanb_201_bulost_m	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	RMNH_RENA_47201	Bugarska: Ostar Kamak	M
ivanb_202_bulost_m	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	47202	Bugarska: Ostar Kamak	M
ivanb_203_bulost_m	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	RMNH_RENA_47203	Bugarska: Ostar Kamak	M
ivanb_204_bulost_f	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	RMNH_RENA_47204	Bugarska: Ostar Kamak	Ž
ivanb_206_bulost_f	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	RMNH_RENA_47206	Bugarska: Ostar Kamak	Ž
ivanb_209_bulost_f	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	RMNH_RENA_47209	Bugarska: Ostar Kamak	Ž
ivanb_210_bulost_f	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	47210	Bugarska: Ostar Kamak	Ž
ivanb_211_bulost_f	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	RMNH_RENA_47211	Bugarska: Ostar Kamak	Ž

ID	Vrsta	Zbirka	Broj	Populacija	Pol
ivanb_212_bulost_f	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	47212	Bugarska: Ostar Kamak	Ž
ivanb_213_bulost_f	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	RMNH_RENA_47213	Bugarska: Ostar Kamak	Ž
ivanb_216_bulost_f	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	RMNH_RENA_47216	Bugarska: Ostar Kamak	Ž
ivanb_442_bullev_m	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	ZMA_9134_442	Bugarska: Levski	M
ivanb_443_bullev_m	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	ZMA_9134_443	Bugarska: Levski	M
ivanb_444_bullev_m	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	ZMA_9134_444	Bugarska: Levski	M
ivanb_445_bullev_m	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	ZMA_9134_445	Bugarska: Levski	M
ivanb_769_bullev_f	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	ZMA_9134_769	Bugarska: Levski	Ž
ivanb_770_bullev_f	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	ZMA_9134_770	Bugarska: Levski	Ž
ivanb_772_bullev_f	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	ZMA_9134_772	Bugarska: Levski	Ž
ivanb_773_bullev_f	<i>T. ivanbureschi</i>	NATURALIS	ZMA_9134_773	Bugarska: Levski	Ž
maced_658_greano_f	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	ZMA_9085_658	Grčka: Ano Kaleniki	Ž
maced_659_greano_f	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	ZMA_9085_659	Grčka: Ano Kaleniki	Ž
maced_660_greano_f	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	ZMA_9085_660	Grčka: Ano Kaleniki	Ž
maced_661_greano_f	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	ZMA_9085_661	Grčka: Ano Kaleniki	Ž
maced_674_greano_m	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	ZMA_9085_674	Grčka: Ano Kaleniki	M
maced_675_greano_m	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	ZMA_9085_675	Grčka: Ano Kaleniki	M
maced_676_greano_m	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	ZMA_9085_676	Grčka: Ano Kaleniki	M
maced_896_bihvis_m	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	ZMA_9118_896	BiH: Višegrad	M
maced_898_bihvis_m	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	ZMA_9118_898	BiH: Višegrad	M
maced_899_bihvis_f	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	9118_899	BiH: Višegrad	M
maced_900_bihvis_N	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	9118_900	BiH: Višegrad	M
maced_901_bihvis_f	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	ZMA_9118_901	BiH: Višegrad	Ž
maced_902_bihvis_f	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	9118_902	BiH: Višegrad	Ž
maced_903_bihvis_f	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	9118_903	BiH: Višegrad	Ž
maced_904_bihvis_f	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	ZMA_9118_904	BiH: Višegrad	Ž
maced_906_bihvis_f	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	ZMA_9118_906	BiH: Višegrad	Ž
maced_907_bihvis_f	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	ZMA_9118_907	BiH: Višegrad	Ž
maced_909_bihvis_f	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	ZMA_9118_908	BiH: Višegrad	Ž
maced_962_bihvis_m	<i>T. macedonicus</i>	NATURALIS	ZMA_9118_962	BiH: Višegrad	M
mcxiv_454_srbvla_m	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23454	Srbija: Vlasi	M
mcxiv_455_srbvla_f	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23455	Srbija: Vlasi	Ž
mcxiv_456_srbvla_f	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23456	Srbija: Vlasi	Ž
mcxiv_457_srbvla_f	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23457	Srbija: Vlasi	Ž
mcxiv_458_srbvla_f	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23458	Srbija: Vlasi	Ž
mcxiv_459_srbvla_m	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23459	Srbija: Vlasi	M
mcxiv_460_srbvla_m	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23460	Srbija: Vlasi	M
mcxiv_462_srbvla_f	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23462	Srbija: Vlasi	Ž
mcxiv_463_srbvla_f	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23463	Srbija: Vlasi	Ž
mcxiv_467_srbvla_m	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23467	Srbija: Vlasi	M
mcxiv_468_srbvla_m	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23468	Srbija: Vlasi	M
mcxiv_469_srbvla_f	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23469	Srbija: Vlasi	Ž
mcxiv_470_srbvla_f	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23470	Srbija: Vlasi	Ž
mcxiv_471_srbvla_m	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23471	Srbija: Vlasi	M
mcxiv_472_srbvla_f	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23472	Srbija: Vlasi	Ž
mcxiv_474_srbvla_f	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23474	Srbija: Vlasi	Ž

ID	Vrsta	Zbirka	Broj	Populacija	Pol
mexiv_475_srbvla_f	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23475	Srbija: Vlasi	Ž
mexiv_476_srbvla_f	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23476	Srbija: Vlasi	Ž
mexiv_477_srbvla_m	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23477	Srbija: Vlasi	M
mexiv_478_srbvla_f	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23478	Srbija: Vlasi	Ž
mexiv_479_srbvla_m	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23479	Srbija: Vlasi	M
mexiv_480_srbvla_m	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23480	Srbija: Vlasi	M
mexiv_482_srbvla_m	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23482	Srbija: Vlasi	M
mexiv_483_srbvla_m	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23483	Srbija: Vlasi	M
mexiv_484_srbvla_f	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23484	Srbija: Vlasi	Ž
mexiv_485_srbvla_f	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23485	Srbija: Vlasi	Ž
mexiv_486_srbvla_m	<i>T. iva × T. mac</i>	IBISS	G23486	Srbija: Vlasi	M

## 9 Biografija autora

---

Tijana Vučić rođena je 20.08.1986. godine u Beogradu. Nakon završene Pete beogradske gimnazije, školske 2005/2006. godine upisuje Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Biologija. Diplomirala je 2014. godine odbranom diplomskog rada pod nazivom „Morfološka razlike između filogenetskih linija običnog zviždaka (*Phylloscopus collybita collybita* i *Phylloscopus collybita abietinus*) na području zone hibridizacije u Srbiji“. Školske 2015/2016. godine, upisala je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, modul Morfologija, sistematika i filogenija životinja. Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za evolucionu biologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu.

Od školske 2015/2016. godine angažovana je kao student doktorskih studija saradnik u nastavi na katedri za Morfologiju, sistematiku i filogeniju životinja Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od septembra 2016. do jula 2017. godine, bila je zaposlena na istoj katedri kao istraživač pripravnik na projektu OI 173043: „Diverzitet vodozemaca i gmizavaca Balkana: evolucionni aspekti i konzervacija“ (Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja). Od jula 2017. do avgusta 2018. godine bila je zaposlena na Odeljenju za evolucionu biologiju Instituta za biološka istraživanja. Zvanje istraživač saradnik stekla je u aprilu 2018. godine odlukom naučnog veća Instituta. Od avgusta 2018. do danas zaposlena je kao istraživač saradnik na katedri za Morfologiju, sistematiku i filogeniju životinja Biološkog fakulteta na istom projektu. Tokom 2018. godine bila je angažovana na projektu „Monitoring vodozemaca i gmizavaca Nacionalnog parka Kopaonik“ (JP Nacionalni park „Kopaonik“). Kao student doktorskih studija učestvovala je na projektu „Procena ugroženosti staništa gmizavaca u Pčinjskom regionu kroz karakteristike distribucije i fitnesa populacija *Podarcis erhardii*“ (Raford fondacija) tokom 2018. godine.

U toku dosadašnjeg naučnog rada objavila je tri rada u međunarodnim (dva iz teze na kojima je prvi autor) i jedan rad u nacionalnom časopisu. Rezultate doktorske disertacije prezentovala je na četiri međunarodna kongresa.

Član je Evropskog herpetološkog društva (*Societas Europaea Herpetologica* – SEH) i Društva za proučavanje evolucije (*Society for the Study of Evolution* – SSE).

## Izjave

---

### Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Tijana Vučić

Broj indeksa B3024/2015

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Hibridizacija, morfološka varijabilnost i stabilnost razvića velikih mrmoljaka (*Triturus* spp.)

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Tijana Vučić  
Broj indeksa B3026/2015  
Studijski program Biologija  
Naslov rada Hibridizacija, morfošološka varijabilnost i stabilnost razvića velikih mrmoljaka (*Triturus* spp.)  
Mentorke dr Ana Ivanović, dr Milena Cvijanović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjena u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_



## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Hibridizacija, morfološka varijabilnost i stabilnost razvića velikih mrmoljaka (*Triturus* spp.)

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
- 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.  
Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.