

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ana I. Radmilović

**Fenotipska plastičnost žutotrbog mukača
(*Bombina variegata*) u uslovima isušivanja
staništa**

doktorska disertacija

Beograd, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ana I. Radmilović

**Phenotypic plasticity of the yellow-bellied
toad (*Bombina variegata*) under habitat
drying conditions**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025

Mentori:

dr Nataša Tomašević Kolarov, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
Univerzitet u Beogradu

dr Imre Krizmanić, vanredni profesor
Biološki fakultet
Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Ana Ivanović, redovni profesor
Biološki fakultet
Univerzitet u Beogradu

dr Tanja Vukov, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
Univerzitet u Beogradu

dr Marko Prokić, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Najveću zahvalnost dugujem mentorki dr Nataši Tomašević Kolarov, naučnom savetniku, na velikom poverenju koje mi je ukazala, idejama prilikom izbora teme, kao i velikom strpljenju u radu sa mnom. Hvala Vam što smo zajedničkim snagama završile ovu tezu.

Veliko hvala mentoru prof. dr Imreu Krizmaniću na ukazanom poverenju, zajedničkim terenima i podršci tokom izrade ove disertacije.

Posebno hvala dr Tanji Vukov na svim smernicama i sugestijama tokom svih faza izrade doktorske disertacije.

Veliko hvala dr Marku Prokiću koji je imao značajnu ulogu u delovima doktorata vezanim za fiziološki deo, kao i dr Tamari Petrović na velikoj pomoći i lepom druženju. Takođe, hvala i drugim kolegicama sa Odeljenja za fiziologiju.

Veliko hvala i ostalim divnim kolegama iz kancelarije: dr Marku Mirču na nesebičnoj pomoći oko sprovođenja svih eksperimenata; dr Mileni Cvijanović i dr Maji Ajduković za pomoć u drugom eksperimentu i lepom druženju; dr Aleksandru Uroševiću na kratkim korisnim lekcijama iz morfometrije i fotografijama koje su u ovoj tezi; dr Katarini Ljubisavljević i dr Marku Anđelkoviću.

Veliko hvala svim studentima koji su mi pomagali u tehničkim neizostavnim poslovima svakog eksperimenta. Znam da niste voleli da perete kutije, ali se nadam da ste od nas nešto i naučili. Marina, to zajedničko pranje kutija je započelo naše divno prijateljstvo.

Veliko hvala mojoj drugarici, kolegici i kumi Katarini Hočevar na svim podsticajima i ohrabrenjima kada je bilo teško.

Ogromnu zahvalnost za sve što sam postigla dugujem svojim roditeljima i bratu koji su uvek bili uz mene.

Posebnu zahvalnost dugujem svom suprugu Mihajlu, sa kojim je sve i počelo, još na osnovnim studijama. Hvala ti što si uvek verovao u mene i svojim radom me podsticao da radim još više i kada mi nije bilo do toga.

Magdalena, devojčice naša, hvala što si pisanje ovog doktorata obojila iščekivanjem i nestrpljenjem kada ću te prvi put videti. Takođe hvala što si bila mirna dok je mama završavala tezu. Bez tebe i tvog tate ništa od ovoga ne bi imalo smisla.

Fenotipska plastičnost žutotrbog mukača (*Bombina variegata*) u uslovima isušivanja staništa

Sažetak

Ekološki uslovi u prirodi su promenljivi, pa organizmi moraju biti sposobni da se prilagode tim promenama kako bi opstali. Sposobnost jednog genotipa da u odgovoru na promene sredine modifikuje razviće, osobine životne istorije, morfologiju i ponašanje naziva se fenotipska plastičnost.

Isušivanje staništa predstavlja jedan od najsnažnijih abiotičkih stresora koji remeti životni ciklus vodozemaca. Mnoge vrste bezrepih vodozemaca imaju sposobnost da ubrzaju razviće i završe metamorfozu pre nego što stanište presuši. U ovoj disertaciji ispitali smo kako isušujući uslovi staništa utiču na osobine životne istorije, morfologiju i fiziologiju žutotrbog mukača (*Bombina variegata*). Rezultati su pokazali da ispitana populacija nema sposobnost da ubrza razviće u isušujućim uslovima. Naprotiv, larvalni period je bio produžen ili nepromenjen, nezavisno od stadijuma razvića u kom su jedinke bile izložene isušivanju. Isušujući uslovi su negativno uticali na dužinu tela i masu jedinki, što se negativno odrazilo na stopu rasta i kondicioni indeks, na početku (GS 42) i na kraju metamorfoze (GS 46). Međutim, to se nije odrazilo na dužinu i oblik repa niti na skakačke performanse juvenilnih jedinki. Takođe, nisu zabeležene promene u nivou kortikosterona ni u parametrima antioksidacionog sistema.

Nepromenjen ili produžen larvalni period u uslovima isušivanja, uz stabilne fiziološke parametre, ukazuju na moguću modifikaciju HPI ose kod ove populacije. Ovi rezultati sugerišu da je populacija žutotrbog mukača sa ispitivanog lokaliteta lokalno adaptirana na specifične hidrološke uslove putem genetičke asimilacije.

Ključne reči: fenotipska plastičnost, žutotrbog mukač, isušivanje staništa, osobine životne istorije, morfologija, fiziologija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Zoologija

UDK broj: (597.825 + 57.033):(502.51(285.3)+627.152.156)(043.3)

Phenotypic plasticity of the yellow-bellied toad (*Bombina variegata*) under habitat drying conditions

Summary

Environmental conditions in nature are constantly changing, requiring organisms to adjust in order to survive. The ability of a single genotype to alter its development, life-history traits, morphology, and behavior in response to environmental variation is known as phenotypic plasticity.

Habitat desiccation is one of the most severe abiotic stressors that disrupts the life cycle of amphibians. Many species of anurans can accelerate their development and complete metamorphosis before their aquatic habitats dry out. In this dissertation, we investigated how desiccation conditions affect life-history traits, morphology, and physiology in the yellow-bellied toad (*Bombina variegata*). Our results show that the studied population lacks the ability to accelerate development under desiccation stress. On the contrary, the larval period was either prolonged or unchanged, regardless of the developmental stage at which individuals were exposed to drying conditions. Desiccation negatively affected body length and mass, leading to a reduced growth rate and lower condition index at both the beginning (GS 42) and the end of metamorphosis (GS 46). However, these unfavorable conditions did not affect tail length or shape, nor did they impair the jumping performance of juvenile individuals. Additionally, no changes were observed in corticosterone levels or in parameters of the antioxidant system.

The absence of developmental acceleration, along with stable physiological responses under desiccation stress, suggests a possible modification of the HPI axis in this population. These findings indicate that the *B. variegata* population from the studied locality may be locally adapted to specific hydrological conditions through genetic assimilation.

Key words: phenotypic plasticity, yellow-bellied toad, habitat desiccation, life-history traits, morphology, physiology

Scientific field: Biology

Scientific discipline: Zoology

UDC number: (597.825 + 57.033):(502.51(285.3)+627.152.156)(043.3)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Fenotipska plastičnost	1
1.1.1 Fenomen fenotipske plastičnosti i norme reakcije.....	1
1.1.2 Adaptivna i neadaptivna fenotipska plastičnost	3
1.1.3 Cena i ograničenja fenotipske plastičnosti.....	5
1.1.4 Plastičnost osobina životne istorije i morfoloških osobina.....	6
1.2 Opšte odlike bezrepih vodozemaca (Anura).....	8
1.2.1 Složen životni ciklus bezrepih vodozemaca.....	8
1.2.2 Metamorfoza bezrepih vodozemaca	8
1.2.2.1 Neuroendokrina regulacija metamorfoze.....	9
1.3 Uticaj stresnih faktora na vodozemce	10
1.4 Odlike bezrepih vodozemaca (Anura) u uslovima isušivanja staništa.....	11
1.4.1 Složen životni ciklus bezrepih vodozemaca u uslovima isušivanja staništa	11
1.4.2 Metamorfoza bezrepih vodozemaca u uslovima isušivanja staništa.....	12
1.4.2.1 Modeli o optimalnom vremenu metamorfoze kod bezrepih vodozemaca.....	13
1.4.2.2 Neuroendokrina regulacija metamorfoze u uslovima isušivanja staništa.....	14
1.4.3 Plastičnost u morfološkim strukturama punoglavaca i juvenilnih jedinki bezrepih vodozemaca u uslovima isušivanja staništa.....	15
1.4.4 Plastičnost u antioksidacionom zaštitnom sistemu bezrepih vodozemaca u uslovima isušivanja staništa	17
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	20
3. MATERIJAL I METODE	21
3.1 Objekat istraživanja	21
3.1.1 Opšte karakteristike roda <i>Bombina</i>	21
3.1.2 Opšte karakteristike žutotrbug mukača (<i>Bombina variegata</i>).....	21
3.1.3 Rasprostranjenje žutotrbug mukača	23
3.2 Eksperimentalni dizajn	25
3.2.1 Opis odabranih ontogenetskih stadijuma i gajenje jedinki	25
3.3 Prikupljanje podataka.....	27
3.3.1 Prikupljanje podataka za analize osobina životne istorije.....	27
3.3.2 Prikupljanje podataka za analize morfoloških osobina i odabir specifičnih tačaka	28
3.3.3 Prikupljanje podataka za analize fizioloških osobina.....	33
3.4 Eksperiment I: Utvrđivanje sposobnosti žutotrbug mukača da ubrza razviće u uslovima isušivanja staništa	34

3.4.1 Statističke analize.....	38
3.5 Eksperiment II: Utvrđivanje najosetljivijeg perioda razvića na isušivanje staništa u razviću žutotrbog mukača	40
3.5.1 Statističke analize.....	44
3.6 Eksperiment III: Uloga kortikosterona u variranju osobina životne istorije i morfologije žutotrbog mukača u uslovima isušivanja staništa.....	45
3.6.1 Statističke analize.....	49
4. REZULTATI	51
4.1 Eksperiment I: Utvrđivanje sposobnosti žutotrbog mukača da ubrza razviće u uslovima isušivanja staništa	51
4.1.1 Osobine životne istorije	51
4.1.1.1 Grupni rast jedinki do metamorfoznog klimaksa (GS 42).....	51
4.1.1.2 Osobine životne istorije pod uticajem različitih vodenih uslova u metamorfoznom klimaksu (GS 42) i metamorfozi (GS 46).....	54
4.1.1.3 Preživljavanje jedinki od početka eksperimenta (GS 25) do metamorfoze (GS 46).....	59
4.1.2 Morfološke osobine.....	59
4.1.2.1 Morfološke osobine jedinki pod uticajem različitih vodenih uslova u metamorfoznom klimaksu (GS 42).....	59
4.1.2.2 Morfološke osobine i skakačke performanse jedinki pod uticajem različitih vodenih uslova u metamorfozi (GS 46).....	61
4.2 Eksperiment II: Utvrđivanje najosetljivijeg perioda razvića na isušivanje staništa u razviću žutotrbog mukača	65
4.2.2 Osobine životne istorije.....	65
4.2.2.1 Osobine životne istorije pod konstantnim i sniženim vodenim uslovima u određenim fazama razvića, merene u metamorfoznom klimaksu (GS 42) i metamorfozi (GS 46).....	65
4.2.2.2 Preživljavanje jedinki od početka eksperimenta (GS 25) do metamorfoze (GS 46).....	71
4.2.3 Morfološke osobine	71
4.2.3.1 Morfološke osobine jedinki pod konstantnim i sniženim vodenim uslovima u određenim fazama razvića, merene u metamorfoznom klimaksu (GS 42).....	71
4.3 Eksperiment III: Uloga kortikosterona u variranju osobina životne istorije i morfologije žutotrbog mukača u uslovima isušivanja staništa.....	72
4.3.1 Osobine životne istorije	72
4.3.1.1 Osobine životne istorije pod uticajem različitih vodenih uslova i manipulacijom kortikosterona u metamorfoznom klimaksu (GS 42).....	72

4.3.1.2 Preživljavanje jedinki od početka eksperimenta (GS 35) do metamorfoznog klimaksa (GS 42).....	78
4.3.2 Fiziološke osobine	78
4.3.2.1 Uticaj različitih vodenih uslova i manipulacija kortikosteronom na nivo kortikosterona u prometamorfozi (GS 35) i metamorfoznom klimaksu (GS 42)	78
4.3.2.2 Uticaj različitih vodenih uslova i manipulacija kortikosteronom na parametre oksidacionog stresa u prometamorfozi (GS 35) i metamorfoznom klimaksu (GS 42)	80
4.3.3 Morfološke osobine	83
4.3.3.1 Morfološke osobine jedinki pod uticajem različitih vodenih uslova i manipulacijom kortikosterona u metamorfoznom klimaksu (GS 42).....	83
5. DISKUSIJA.....	86
5.1 Uticaj isušivanja staništa na osobine životne istorije žutotrbog mukača	86
5.1.1 Nepostojanje razvojnog prozora za ubrzanje razvića žutotrbog mukača u isušujućim uslovima	89
5.2 Uticaj isušivanja staništa na morfološke osobine punoglavaca i prenosni efekti (<i>carry-over effects</i>) na juvenilne jedinke žutotrbog mukača	91
5.3 Uticaj različitih vodenih uslova i manipulacija kortikosteronom na nivo kortikosterona i parametre oksidacionog stresa	93
6. ZAKLJUČCI	98
7. LITERATURA	99
8. PRILOZI	115

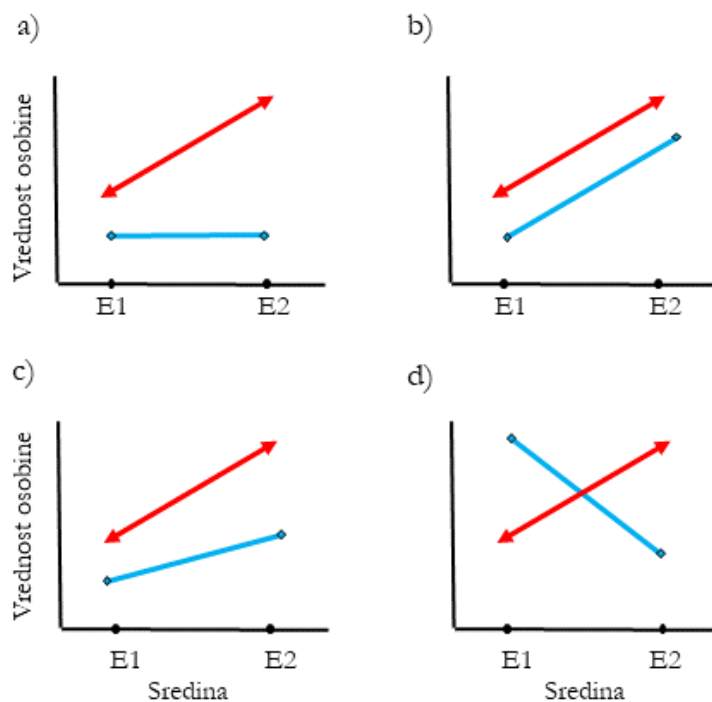
1. UVOD

1.1 Fenotipska plastičnost

1.1.1 Fenomen fenotipske plastičnosti i norme reakcije

Ekološki uslovi koji vladaju u prirodi se neprestano menjaju kao rezultat složenih interakcija biotičkih i abiotičkih faktora. Zbog prirode ovih interakcija, organizmi su prinuđeni da brzo detektuju promene u svom okruženju i odgovore na njih kako bi opstali u datim uslovima. Jedinke mnogih biljnih i životinjskih vrsta imaju sposobnost da menjaju svoje ponašanje, fiziologiju, morfologiju, dinamiku rasta i druge osobine životne istorije kao reakciju na sredinske promene i ta sposobnost organizama da se menjaju pod uticajem sredine se naziva fenotipska plastičnost (Pigliucci i sar., 2006). Fenotipska plastičnost predstavlja jednu od osnovnih komponenti fenotipske varijabilnosti. To je sposobnost jednog genotipa da, usled delovanja različitih sredinskih faktora, formira različite fenotipove (West-Eberhard, 2003). U širem smislu, može se reći da se fenotipska plastičnost nekog organizma odnosi na sve osobine njegovog fenotipa koje se menjaju pod uticajem sredine. Intenzitet plastičnog odgovora je specifičan za svaku vrstu i svaku osobinu, a takođe i za svaki sredinski stimulus. Stoga, data sredina može indukovati plastični odgovor neke osobine koji neće biti ispoljen u nekim drugim sredinama, a s druge strane, promena u sredini može indukovati više različitih plastičnih odgovora. Bitno je istaći da, iako je fenotipska plastičnost genetički determinisana (u ovom kontekstu, genotip se odnosi na skup svih gena koji utiču na razvoj određene osobine), ona nije univerzalna karakteristika genotipa, već je specifična za određenu osobinu ili skup osobina (Via i Lande, 1987; Van Kleunen i Fisher, 2005). Plastičnost povećava fenotipski diverzitet i olakšava održavanje genetičke varijabilnosti u populaciji, tako što prikriva genetičku varijabilnost od delovanja selekcije (Draghi i Whitlock, 2012; Gómez Mestre i Jovani, 2013), a takođe ima bitnu ulogu u divergenciji između populacija što posledično može uticati na procese specijacije (Price i sar., 2003; Pfennig i sar., 2010; Davidson i sar., 2011). Plastičnost se takođe smatra evolutivnom adaptacijom na promene u sredini koje su predvidive i dešavaju se unutar životnog veka jedinki, jer omogućava jedinkama da prilagode svoj fenotip različitim okruženjima (West-Eberhard, 2003).

Plastičnost neke osobine uobičajeno se prikazuje normom reakcije koja predstavlja grafički prikaz svih fenotipova koje jedan genotip može ispoljiti u različitim sredinama (Sultan, 1987) (**Slika 1.**). Na ovom dijagramu prikazan je jedan genotip u dve sredine, pri čemu su sredine predstavljene na x-osi, a fenotipske vrednosti osobine na y-osi (npr. vrednosti dužine tela, mase, larvalnog perioda itd.). Kako bi se lakše uočile razlike u srednjim vrednostima osobine koju jedan genotip može proizvesti u različitim sredinama, te vrednosti se povezuju linijama. Na taj način, svaki genotip dobija svoj dijagram norme reakcije. Nagib norme reakcije pokazuje nivo plastičnosti posmatrane osobine. Što znači da će neki genotip ukoliko nije plastičan u različitim sredinama imati ravnu normu reakcije, odnosno srednja vrednost osobine koja se posmatra biće nepromenjena (**Slika 1. a**) - plavi genotip). Genotipovi koji imaju paralelne norme reakcije pokazuju isti pravac i opseg fenotipske promene (**Slika 1. b**) u dve sredine, i pretpostavlja se da su mehanizmi koji regulišu odgovore na okolinu isti kod različitih genotipova. Nasuprot tome, kada se norme reakcije razlikuju u nagibu ili se preklapaju, to ukazuje na genetičku varijabilnost u načinu na koji genotipovi percipiraju i obrađuju signale iz okoline, odnosno na postojanje genetičke varijabilnosti u fenotipskoj plastičnosti (Conover i Schultz, 1995) (**Slika 1. c** i **d**)).



Slika 1. Prikaz norme reakcije za dva genotipa u dve različite sredine. Na x -osi su predstavljene vrednosti nekog sredinskog faktora u sredinama E1 i E2, dok y -osa prikazuje fenotipske vrednosti određene osobine. Genotipovi su označeni različitim bojama. a) Genotip označen crvenom bojom je plastičan u ove dve sredine (kosa norma reakcije), tj. pokazuje promenu vrednosti osobine u ove dve sredine; genotip označen plavom bojom nije plastičan u ove dve sredine što je prikazano ravnom normom reakcije. b) Oba genotipa imaju iste (paralelne) norme reakcije, tj. genotipovi pokazuju isti pravac i opseg fenotipske promene. c) U ovom slučaju norme reakcije dva genotipa nisu paralelne, odnosno njihovi fenotipski odgovori se razlikuju. d) Norme reakcije dva genotipa se ukrštaju što znači da im se vrednosti osobine u različitim sredinama menjaju na različite načine, odnosno postoji genetička varijabilnost u načinima primanja i obrade signala iz okoline (preuzeto i modifikovano prema: Stojković i Tucić, 2012).

Velika genetička varijabilnost praćena različitim sredinskim uslovima nije uvek povezana sa visokom fenotipskom varijabilnošću. Smatra se da je razlog za to postojanje kanalisnosti razvića. Kanalisnost razvića je prvi definisao Vodington (Waddington, 1942) kao sposobnost proizvodnje doslednog fenotipa uprkos varijabilnim genetičkim i/ili sredinskim faktorima. Kasnije, Vodington je proširio ovu definiciju uvodeći koncept genetičke asimilacije kao njen ključni aspekt. U proširenoj definiciji, Vodington je dodao ideju da se fenotipske reakcije organizma na stresne sredinske uslove mogu postepeno ustaliti u populaciji kroz prirodnu selekciju, postajući trajne i genetički određene (Waddington, 1961). Na taj način dolazi do kanalisanja favorizovanog fenotipa kao i molekularnih mehanizama koji onemogućavaju dalju podložnost osobina jedinki da se menjaju kao odgovor na promene u sredini. U poslednjih nekoliko decenija, formulisano je mnogo različitih definicija kanalisnosti, prvenstveno zbog novih otkrića u vezi sa genetičkom osnovom i evolutivnim značajem ove komponente fenotipske varijabilnosti (Takahashi, 2019). Genetička kanalisnost podrazumeva otpornost fenotipa prema genetičkim promenama ili mutacijama, što znači da će organizam razviti stabilan fenotip čak i ako se desi promena na genetičkom nivou

(Takahashi, 2019). Na ovaj način se u populaciji akumulira genetička varijabilnost koja nije dostupna prirodnoj selekciji. Međutim, ako se sredinski uslovi promene (npr. populacija se izloži nekom stresu) ova akumulirana genetička varijabilnost može postati predmet delovanja prirodne selekcije i predstavljati materijal za nove pravce evolucionih promena. Dok traju izmenjeni sredinski uslovi, selekcija može nastaviti da favorizuje genetičke promene i oblikuje fenotip indukovano sredinom u novu adaptivnu formu. Ovaj proces se označava terminom „genetička akomodacija“ (engl. *genetic accommodation*) i može izazvati promenu kako u regulaciji plastičnosti tako i u obliku fenotipa dovodeći do boljeg uklapanja između fenotipa i sredine (West-Eberhard, 2003).

Sredinska kanalisnost podrazumeva sposobnost organizma da održava stabilan fenotip bez obzira na promene u sredini. U ovom kontekstu, kanalisnost predstavlja otpornost razvića prema spoljašnjim uticajima koji bi mogli uticati na funkcionisanje ili izgled organizma (Debat i David, 2001; Takahashi, 2019). Pretpostavka je da će kanalisane osobine imati isti selektivni optimum u okviru različitih sredinskih uslova. Otpornost fenotipa na nespecifične promene u sredini, kao što su na primer varijacije između jedinki iste populacije, kao i nagli rast fenotipske varijabilnosti pod uticajem ekstremnih sredinskih promena na koje se vrsta nije prilagodila tokom svoje evolucije, idu u prilog ovoj hipotezi (Debat i David, 2001). Istraživanja su pokazala da neke fenotipske osobine koje su kanalisane pod optimalnim sredinskim uslovima mogu da postanu varijabilne što zavisi od intenziteta sredinskih poremećaja (Stearns i Kawecki, 1994; Dworkin, 2005).

1.1.2 Adaptivna i neadaptivna fenotipska plastičnost

Adaptivna vrednost (engl. *fitness*) se definiše kao verovatnoća preživljavanja i reprodukcije genotipova (jedinki) i ispoljava se preko performansi fenotipa u konkretnoj životnoj sredini. Fitness jedinki se može izmeriti kao apsolutni i relativni fitness. Apsolutni fitness predstavlja prosečan broj potomaka jedinke određenog genotipa u narednoj generaciji. Relativni fitness predstavlja prosečan doprinos koji nosioci određenog genotipa daju genskom fondu naredne generacije u odnosu na ostale genotipove (Tucić, 2003). U zavisnosti od toga kakav uticaj ima plastična osobina na fitness jedinki, razlikuje se adaptivna i neadaptivna (maladaptivna, neizbežna) fenotipska plastičnost.

Adaptivna plastičnost je korisna plastičnost, tj. ona plastičnost neke osobine koja omogućava jedinkama da imaju veću adaptivnu vrednost u novom okruženju nego što bi bio slučaj da ova osobina nije plastična (Ghalambor i sar., 2007). U slučaju nagle promene u sredini, pretpostavlja se da adaptivna fenotipska plastičnost omogućava organizmima da: 1) adaptivno modifikuju osobine u veoma kratkom (unutar-generacijskom) vremenskom periodu, 2) pomogne u početnom opstanku populacija, i 3) smanji verovatnoću izumiranja (Gibert i sar., 2019). Kada se naglo promeni sredina koju neka populacija naseljava, efekat direkcione selekcije je jak. U tim situacijama adaptivna fenotipska plastičnost ima ključnu ulogu u sposobnosti neke vrste da prvo preživi a zatim da se prilagodi izmenjenim uslovima sredine tako što redukuje jak efekat direkcione selekcije i omogućava populacijama da se lakše kreću s jednog adaptivnog vrha na drugi. Brzina prilagođavanja novom okruženju će zavisiti od toga koliko je ispoljeni plastični fenotip sličan optimalnom fenotipu za novo okruženje (Price i sar., 2003). Kada adaptivna plastičnost proizvede fenotip koji se poklapa sa optimalnim fenotipom u novom okruženju, na njega deluje stabilizaciona selekcija, bez daljeg genetičkog razdvajanja jedinki u populaciji osim u slučaju kada je visoka cena ispoljene plastičnosti (npr. Price i sar., 2003; West-Eberhard, 2003; Pfennig, 2021).

Postoje mnogi primeri adaptivne fenotipske plastičnosti. Na primer, tokom odgajanja punoglavaca u laboratorijskim uslovima u prisustvu i odsustvu predatora uočavaju se značajne promene u morfologiji punoglavaca. Punoglavci odgajani u neposrednoj blizini predatora su imali

manju dužinu tela i izmenjenu morfologiju repa. Eksperiment selekcije punoglavaca sa izmenjenom i neizmenjenom morfologijom usled prisustva predatora je pokazao da su punoglavci koji nisu odgajani u prisustvu predatora (tj. oni koji nisu izmenili svoju morfologiju) imali veću stopu smrtnosti u poređenju s onima koji su izmenili morfologiju u prisustvu predatora. Drugim rečima, punoglavci odgajani u prisustvu predatora koji su ispoljili plastičan odgovor u morfološkim osobinama su imali i bolje preživljavanje, tj. njihova ispoljena plastičnost je bila adaptivna (Van Buskirk i Relyea, 1998).

Iako je prirodna selekcija dovela do evolucije adaptivne plastičnosti, nisu sve plastične promene adaptivne. Neadaptivna ili maladaptivna fenotipska plastičnost se definiše kao promena koju indukuje sredina, a koja pomera nastali fenotip dalje od fenotipskog optimuma (Ghalambor i sar., 2007; Morris i Rogers, 2013; Gibert i sar., 2019), tj. utiče negativno na fitnes jedinki koje su ispoljile ovaj fenotip. Prema takvoj definiciji, neadaptivna plastičnost nije korisna u smislu individualne sposobnosti preživljavanja jedinki jer povećava razliku između optimalnog i posmatranog fenotipa. Na nivou populacije, prisustvo neadaptivne plastičnosti se najčešće viđa kod pionirskih populacija, u uslovima sredine koji su novi za datu populaciju i gde selekcija ranije nije imala priliku da deluje na genetičku varijabilnost za plastičnost (Ghalambor i sar., 2007). Na primer, poređenje adaptiranosti dve populacije vrste *Hyla cinerea* poreklom iz staništa različitog saliniteta pokazalo je da kod jedinki koje potiču iz nezaslanjenog staništa porast saliniteta negativno utiče na sve osobine životne istorije, fitnes, kao i na morfologiju glave i repa punoglavaca. S druge strane, fenotip jedinki poreklom sa zaslanjenog staništa je ostao neizmenjen usled lokalne adaptacije (Albecker i McCoy, 2019). Ekstremne promene u kvalitetu životne sredine mogu dovesti do ispoljavanja neadaptivnih fenotipova, zbog čega može doći do lokalnog izumiranja (Moritz i Agudo, 2013; Urban, 2015). Iako organizmi pokazuju promene u osobinama životne istorije, morfologiji ili ponašanju kao odgovor na izmenjene uslove, ove promene mogu biti suboptimalne i sa negativnim uticajem na fitnes jedinki (West-Eberhard, 2003; Levis i sar., 2016) kao što je slučaj u datom primeru. Međutim, u manje ekstremnim slučajevima, delovanje direkcione selekcije na postojeću ili kriptičnu genetičku i fenotipsku varijabilnost može dovesti do lokalne adaptacije (Albecker i McCoy, 2019). Lokalna adaptacija omogućava organizmima koji se razvijaju u fluktuirajućim sredinama da bolje podnesu te sredinske promene, smanjujući potrebu za neadaptivnim plastičnim odgovorima čime se omogućava ispoljavanje stabilnijeg fenotipa (Kawecki i Ebert, 2004; Lind, 2009). Fenotipska plastičnost pod stresom često je udružena sa visokim energetske zahtevima, posebno kada te promene udaljavaju populaciju od fenotipskog optimuma. Ovi dodatni zahtevi mogu dovesti do iscrpljivanja resursa, smanjenog rasta ili reproduktivnog uspeha, što se smatra neadaptivnim za dugoročni opstanak populacije (Albecker i McCoy, 2019). Neadaptivna plastičnost ima dva potencijalna evolutivna ishoda. Prvi ishod je izumiranje populacije. Izumiranje je uvek moguće kao odgovor na brzo ili jako delovanje selekcije, a bilo koji neadaptivan plastični odgovor povećava ovu mogućnost, posebno ako su osobine na koje je delovala selekcija blisko povezane sa preživljavanjem i mogućnošću reprodukcije (Chevin i sar., 2010; Gibert i sar., 2019). Takođe je bitna i brzina kojom neka populacija može da odgovori na neku sredinsku promenu. Na primer, ukoliko je plastični odgovor na neku promenu u sredini spor ili nedovoljan, organizam može pretrpeti štetu pre nego što ova promena može imati efekta. Ovo kašnjenje često vodi do neadaptivnog odgovora jer organizam ne uspeva da dovoljno brzo reaguje na stres. Drugi potencijalni ishod je brz adaptivni evolutivni odgovor (tj. evolutivno spasavanje). Neadaptivna plastičnost može uz prisustvo dovoljne genetičke varijabilnosti dovesti do adaptivnih promena u srednjoj vrednosti osobine ili reakcionoj normi osobine jer dovodi do ispoljavanja genetičke varijabilnosti na koju ranije nije delovala selekcija (Chevin i sar., 2013; Ghalambor i sar., 2015). Kao rezultat toga povećava se genetička i fenotipska varijabilnost koja je neizražena u uslovima koji su do tada vladali. U tom slučaju, ova plastičnost može biti prolazna pojava koja je važna tokom ranih faza adaptacije kada je razlika između plastičnog odgovora i optimalnog fenotipa najveća i kada je delovanje selekcije najintenzivnije (Ghalambor i sar., 2007).

U populaciji može delovati više različitih sredinskih promena istovremeno (npr. isušivanje staništa i nedostatak hrane) (Enriquez-Urzelai i sar., 2013; Prokić i sar., 2021). Ovo može dovesti do ispoljavanja plastičnog odgovora na jednu promenu ali taj odgovor može biti neadekvatan ili čak štetan u prisustvu druge sredinske promene. Drugim rečima, fenotipske promene koje nastaju kao odgovor na jedan stresor mogu imati dugoročne posledice koje ograničavaju otpornost na druge stresore (Prokić i sar., 2021). Na primer, organizam koji ispolji plastičnost u osobinama životne istorije zbog trenutne promene sredine može imati smanjenu plastičnost u morfološkim osobinama ili manji adaptivni potencijal kada se suoči sa nekom drugom sredinom u budućnosti.

Iako fenotipska plastičnost može povećati prilagodljivost organizma u promenljivim uslovima, ispoljavanje plastičnosti može nositi značajne troškove i ograničenja, što postavlja važno pitanje o njenoj ceni u ekološkom i evolutivnom kontekstu.

1.1.3 Cena i ograničenja fenotipske plastičnosti

Nedostatak dovoljne genetičke varijabilnosti onemogućava evoluciju plastičnosti. Međutim, ako i postoji dovoljna genetička varijabilnost u populaciji, plastičnost se možda i dalje neće razvijati zbog postojanja cene i ograničenja plastičnosti. Cena plastičnosti se ispoljava kroz niži fitnes plastičnog genotipa u odnosu na genotip koji nije plastičan a koji ima isti prosečan fenotip u istom staništu. Ograničenja fenotipske plastičnosti se odnose na faktore koji ograničavaju sposobnost organizma da prilagodi svoj fenotip različitim sredinskim uslovima (DeWitt i sar., 1998).

Prednost plastičnosti je što omogućava oblikovanje fenotipova koji se adekvatno prilagođavaju različitim sredinama, u poređenju s ispoljavanjem jednog fenotipa u svim sredinama. Da ograničenja plastičnosti ne postoje, organizmi bi posedovali savršenu ili beskonačnu plastičnost, ispoljavajući najbolje moguće osobine u svim sredinama bez ikakvih posledica za posedovanje te sposobnosti (DeWitt i sar., 1998; Auld i sar., 2010). Generalno, plastični organizmi ne dostižu ovaj idealan fenotip zbog cene povezane sa plastičnošću. Ograničenja plastičnosti se dešavaju zbog razlika koje postoje između fiksiranog i plastičnog razvića. Fiksirano razviće podrazumeva postojanje genetsko-razvojne mašinerije (strukturnih gena, polimeraza, ribozoma itd.) koja proizvodi očekivani fenotip. S druge strane, regulatorni geni za plastičnost reaguju na promene u životnoj sredini i kontrolišu ekspresiju gena koji direktno određuju stanje osobine (strukturnih gena) (Stojković i Tucić, 2012). Prirodna selekcija utiče na varijabilnost regulatornih gena, odnosno na njihovu ulogu u mreži regulatornih interakcija, nezavisno od evolutivnih promena same osobine (tj. gena realizatora). Odnosno, odgovor plastičnog genotipa na promene sredine uključuje aktiviranje većeg broja molekularnih, biohemijskih, razvojnih i fizioloških puteva, što zahteva veći utrošak materije, energije i vremena u poređenju sa odgovorom fiksno (neplastičnog) genotipa. Ovi dodatni koraci u produkciji plastičnog fenotipa pružaju i dodatne mogućnosti za cenu i ograničenja koja će da se manifestuju u plastičnom razviću u odnosu na fiksno razviće. Cena i ograničenja plastičnosti mogu rasti tokom razvića čak i kada su krajnji produkti plastičnog i fiksiranog razvića isti.

DeWitt i saradnici (1998) su sumirali cenu i ograničenja fenotipske plastičnosti, pri čemu je cena fenotipske plastičnosti: 1) energetska cena održavanja senzornih i regulatornih mehanizama za plastičnost; 2) cena produkcije plastičnog genotipa koja je veća od cene koju plaća fiksni genotip kada produkuje isti fenotip; 3) cena prikupljanja informacija iz spoljašnje sredine što može zahtevati veći utrošak energije; 4) cena razvojne nestabilnosti – u okruženjima koja se stalno menjaju i fenotipovi će imati nestabilno razviće kao posledicu stalnog prilagođavanja različitim uslovima sredine, što može dovesti do nižeg fitnesa; 5) genetička cena – geni koji produkuju

adaptivan plastičan fenotip mogu biti povezani sa genima koji snižavaju fitnes jedinki: plejotropija – geni koji proizvode adaptivan plastičan fenotip mogu imati negativne plejotropne efektne na druge osobine koje nisu plastične; epistaza – regulatorni geni za plastičnost mogu modifikovati ekspresiju drugih gena i tako indirektno imati uticaj na druge osobine.

Ograničenja fenotipske plastičnosti su: 1) pouzdanost informacija: – ako organizmi ne dobiju pouzdane informacije iz spoljašnje sredine, mogu razviti fenotip koji nije dobro prilagođen uslovima sredine; 2) vremensko kašnjenje: – promene u fenotipu zavise od promena u razviću, a kašnjenje između promena u sredini i fenotipskog odgovora može smanjiti fitnes; 3) razvojni opseg – fiksno razviće može proizvesti bolje adaptivne ekstremne fenotipove nego plastično razviće; 4) rane fenotipske strukture – fenotipske strukture koje se formiraju rano u razviću mogu biti efikasnije od dodatnih struktura koje se pojavljuju kasnije kao odgovor na promene u sredini (DeWitt i sar., 1998).

Neki autori smatraju da održavanje plastičnosti u populaciji može biti redukovano selekcijom kao i da cena plastičnosti zavisi od konteksta i da je visoka samo u stresnim uslovima sredine (Dechaine i sar., 2007; Van Buskirk i Steiner, 2009). Dodatno, cena proizvodnje plastične osobine ograničava evoluciju te osobine s obzirom da plastičnost uključuje fenotipsko restrukturiranje na svim nivoima, pa se može reći da se cena proizvodnje određenog fenotipa javlja samo kada se indukuje plastična osobina (Callahan i sar., 2008).

Da li će plastičnost biti povoljna za neku populaciju, zavisi i od staništa koje organizmi naseljavaju. U staništima koja se ne menjaju drastično tokom vremena, očekuje se da će selekcija favorizovati genotipove koji imaju kanalisnije razviće jer će oni imati i nisku cenu plastičnosti u odnosu na plastične genotipove. Plastični genotipovi će biti favorizovani u sredinama koje se stalno menjaju pod uticajem abiotičkih i biotičkih faktora, i u ovakvim sredinama oni će imati veći fitnes od kanalisanih genotipova, iako će i cena plastičnosti biti veća (West-Eberhard, 2003).

1.1.4 Plastičnost osobina životne istorije i morfoloških osobina

Osobine životne istorije obuhvataju karakteristike organizama koje su neposredno vezane za strategije ulaganja resursa u preživljavanje, rast i reprodukciju. Zbog velikog uticaja na fitnes organizama, često se nazivaju osnovnim komponentama adaptivne vrednosti (Tucić i Tucić, 2000; Stojković i Tucić, 2012). Teorije životnih istorija imaju za cilj objašnjavanje različitosti životnih strategija među vrstama, i kako evolucija oblikuje organizme optimalne za reproduktivni uspeh u određenoj sredini (Fabian i Flatt, 2012).

Osnovni princip funkcionisanja živih sistema podrazumeva da se usvojeni resursi rasporede prema različitim procesima koji omogućavaju organizmu da obavi veliki broj funkcija. Odnosno, prikupljena energija se usmerava na različite osobine kao što su masa i veličina tela od kojih će kasnije zavisiti broj i veličina potomaka, masa tela prilikom stupanja u reprodukciju, dužina života i celokupna morfologija jedinki. Organizmi sa složenim životnim ciklusom koji obuhvata različite životne faze, poseduju više prilagođavanja u životnim strategijama nego organizmi sa jednostavnim životnim ciklusom, posebno kada različite životne faze naseljavaju ekološki različite uslove. Genetički i razvojni mehanizmi omogućavaju postembrionske, razvojne promene fenotipa prilikom tranzicije iz jedne u drugu životnu fazu sa ili bez koreliranih efekata na druge faze. Uslovi staništa kojima je organizam izložen u jednoj razvojnoj fazi mogu oblikovati fenotipske osobine te faze, a ti efekti se mogu preneti i na kasnije faze razvoja, menjajući njihove karakteristike (npr. Watkins, 2001; Richter-Boix i sar., 2006a). Međutim, ovaj uticaj ne mora biti pravilo - u nekim slučajevima, promene izazvane u ranijim fazama ostaju ograničene na tu fazu i ne odražavaju se na naredne, što ukazuje na razvojnu nezavisnost između faza (Ebenman, 1992; Moran, 1994).

Prisustvo potpuno diferenciranih, funkcionalnih struktura u jednoj fazi moglo bi da ograniči i morfologiju struktura koje se formiraju kasnije u toku razvića (npr. Hanken, 1992; Tejedo i sar., 2010). Ulaganje resursa u jednu osobinu neminovno vodi smanjenju raspoloživih resursa za ulaganje u neku drugu osobinu, a teorija životnih istorija daje optimizacione modele koji obuhvataju interakciju unutrašnjih uzajamnih ograničenja (engl. *trade-off*) i spoljašnjih faktora. Pošto su osobine životne istorije a i morfološke osobine, kompleksne i u međusobnim specifičnim interakcijama, one i međusobno ograničavaju alokaciju resursa. Jedan od važnih ciljeva u izučavanju morfološke varijabilnosti jeste razumevanje mehanizama i procesa koji generišu morfološku varijabilnost kako u optimalnim tako i u stresnim uslovima. Morfološka varijabilnost nastaje kao rezultat kompleksnih interakcija između genetičke osnove, individualnog razvića i sredinskih faktora na različitim nivoima i u različito vreme tokom razvića (Klingenberg, 2002; Hallgrímsson i sar., 2014). Na primer, pripadnici porodice Scaphiopodidae, koji naseljavaju ekstremna klimatska područja poput pustinja Severne Amerike, gde su padavine retke i voda se kratko zadržava, razvili su specifičnu larvalnu morfologiju koja im omogućava ubrzan rast i razvoj pod jakim selektivnim pritiskom isušivanja staništa. Izmenjena morfologija praćena specifičnom životnom strategijom uzrokovana spoljašnjim uticajima olakšava jedinkama rast, razvoj i preživljavanje pod specifičnim, efemernim uslovima koji vladaju u staništu. U ovom slučaju dolazi do korelacije osobina životne istorije i morfoloških struktura i uspostavlja se specifična životna strategija koja ograničava formiranje drugačijih fenotipova. S obzirom na to da osobine životne istorije direktno utiču na fitnes jedinki, kratkoročne i dugoročne promene u spoljašnjoj sredini mogu imati direktne posledice na strukturu populacije (Maia i sar., 2000). U izmenjenoj sredini one jedinke koje poseduju sposobnost da optimalno rasporede svoje resurse će imati veći fitnes u poređenju sa onim jedinkama koje nisu u stanju da plastično odgovore na izmenjene uslove sredine. Pošto bi plastične jedinke opstajale u populaciji, i učestalost njihovih genotipova bi se povećavala kroz generacije a samim tim bi se populacija približila adaptivnom optimumu. Ovakve, sredinski indukovane promene mogu biti favorizovane ukoliko su usklađene sa adaptivnim pejzažom u novoj sredini (Saeki i sar., 2014). Složen životni ciklus pruža jedinstvene mogućnosti za morfološku evoluciju, što se postiže modifikacijama razvića u odgovarajućoj fazi razvoja. Nastale promene u morfologiji olakšavaju ekološku specijalizaciju i diverzifikaciju kod larvi i adultnih jedinki. Larve se morfološki jasno razlikuju od juvenilnih i adultnih jedinki (Duellman i Trueb, 1994), a zbog različitih uslova sredine u kojima žive izloženi su različitim selektivnim pritiscima (npr. Moran, 1994). Utvrđeno je da promene u osobinama životne istorije i morfologiji larvi utiču na osobine životne istorije i morfologiju adultnih jedinki, tj. imaju prenosne efekte (engl. *carry-over effects*) što može negativno uticati na fitnes jedinki. Odnosno, ova povezanost osobina životne istorije i morfoloških osobina između razvojnih faza, onemogućava nezavisnu evoluciju razvojnih/životnih faza kao što se ranije mislilo (npr. Moran, 1994).

Posebno je zanimljivo izučavati fenomen fenotipske plastičnosti kod organizama sa složenim životnim ciklusom kao što su vodozemci. Poznato je da se zbog života u dve ekološki različite životne sredine – akvatične i terestrične – ovi organizmi suočavaju sa različitim funkcionalnim zahtevima zbog čega su pod različitim selektivnim pritiscima. Tokom metamorfoze vodozemaca dolazi do dramatičnih promena na različitim nivoima organizacije što ih čini idealnim model sistemom za proučavanje plastičnosti.

1.2 Opšte odlike bezrepih vodozemaca (Anura)

1.2.1 Složen životni ciklus bezrepih vodozemaca

Životni ciklus Anura (žaba) se sastoji od nekoliko jasno definisanih razvojnih faza: jaje, larva (punoglavac), juvenilna jedinka i adultna jedinka. Adultne ženke polažu jaja u vodu ili vlažnu sredinu u blizini vode. Kada je fekunditet u pitanju, dobro je poznato da se žabe odlikuju izrazitom varijabilnošću u broju položenih jaja koji je određen veličinom tela ženki. Neke vrste žaba polažu mali broj pojedinačnih jaja, npr. 2-10 jaja kod vrsta kod kojih postoji izražena briga o potomstvu, dok druge polažu jaja u većim ili manjim grupama, koja mogu da sadrže i do nekoliko hiljada jaja (Duellman i Trueb, 1994). Vreme koje protekne od polaganja jaja do metamorfoze je takođe karakteristika vrste i može varirati u zavisnosti od ekoloških uslova. Kratak larvalni period u rasponu od 5 do 10 dana imaju vrste koje žive u privremenim vodama koje brzo isušuju i čija je evolucija životnih strategija išla u pravcu što bržeg razvoja zbog ograničenog trajanja staništa. Najčešći raspon larvalnog perioda za većinu vrsta koje žive u stabilnijim vodenim staništima poput močvara i stalnih jezera je od 15 dana do 3 meseca. Sa druge strane, vrste koje žive u hladnim krajevima, na visokim nadmorskim visinama, imaju larvalni period koji traje i do 2-3 godine zbog usporenog razvoja usled niskih temperatura i sezonskih ograničenja (Duellman i Trueb, 1994).

Nakon izvaljivanja, punoglavac nastavlja svoj razvoj u vodi, diše pomoću škrge i ima dobro razvijen rep koji ima ulogu u lokomociji. Rep je mišićav, bočno spljošten a njegova dorzalna i ventralna strana mišićnog dela repa je okružena repnim "perajima" izgrađenim od epitela i vezivnog tkiva. Punoglavci su herbivori, hrane se algama, i različitim delovima biljaka dok punoglavci nekih vrsta porodice Scaphiopodidae mogu imati omnivorni ili karnivorni način ishrane (Duellman i Trueb, 1994). Faza larve uključuje značajan rast i diferencijaciju punoglavca. Ukoliko su uslovi u staništu povoljni, punoglavci će nastaviti svoj rast i razvoj u datom staništu sve dok ne dostignu minimalnu dužinu i masu tela za otpočinjanje procesa metamorfoze, tj. tranzicije iz akvatične u terestričnu sredinu. Veća veličina tela je adaptivna u terestričnom staništu pošto je dokazano da veće jedinke bolje preživljavaju, imaju veći fekunditet, ranije stupaju u reprodukciju i imaju bolje fiziološke performanse.

Metamorfoza je proces u kojem se punoglavac transformiše u juvenilnu jedinku, i koja uključuje brojne fiziološke, biohemijske, morfološke i promene u ponašanju. Kada je proces metamorfoze završen, jedinka je spremna za život u terestričnim uslovima u blizini vode. Sa dostizanjem reproduktivne zrelosti odrasle jedinke se vraćaju u vodeno stanište radi reprodukcije, čime se zatvara životni ciklus. Kod mnogih vrsta žaba mužjaci proizvode zvuke karakteristične za vrstu kako bi privukli ženku za parenje. Najveći broj vrsta ima spoljašnje oplođenje, dok mali broj rodova ima unutrašnje oplođenje (rodovi *Ascaphus* i *Elentherodactylus* (Grandison i Ashe, 1983; Townsend i Stewart., 1985)). Razviće kod najvećeg broja vrsta podrazumeva fazu larve, mada neke vrste bezrepih vodozemaca imaju direktno razviće dok su druge viviparne.

1.2.2 Metamorfoza bezrepih vodozemaca

Metamorfoza je kritičan period u složenom životnom ciklusu vodozemaca jer u toku ovog perioda dolazi do drastičnih fizioloških, biohemijskih, morfoloških transformacija i promena u ponašanju punoglavca. Krajnji rezultat metamorfoze je fenotipski drugačija juvenilna forma prilagođena za život u terestričnim uslovima (Duellman i Trueb, 1994). Tri najveća tipa promena

koji se dešavaju u tokom procesa metamorfoze bezrepih vodozemaca su: 1) Povlačenje struktura i menjanje funkcija koje su bile bitne samo za punoglavce i život u vodenim uslovima; na primer, dolazi do gubitka unutrašnjih škruga i umesto škruga se razvijaju pluća neophodna za život na kopnu; ovaj prelaz sa škržnog na plućno disanje je postepen, a pre kompletnog završetka procesa metamorfoze jedinke često koriste i škrge i pluća. 2) Transformacija postojećih struktura punoglavaca u nove strukture koje će biti funkcionalne u juvenilnoj/adultnoj fazi na kopnu; na primer, dolazi do kompletne transformacije usnog aparata – larveni usni aparat degeneriše i kod metamorfoziranih jedinki se formiraju usta; usta se šire, a struktura vilice postaje robusnija. Glavni region prolazi kroz značajne funkcionalne i anatomske promene koje omogućavaju život u kopnenim uslovima. Oči se pomeraju dorzalno, što omogućava širi vidokrug za kopneni život. Telo postaje kompaktnije i prilagođava se kopnenom ili semi-akvatičnom načinu života. 3) *De novo* razvoj struktura i funkcija koje će biti esencijalne za adulte (Duellman i Trueb, 1994). Punoglavcima zadnji ekstremiteti počinju da se razvijaju i rastu nekoliko dana nakon izvaljivanja iz jajeta, dok izbijanje prednjih ekstremiteta označava početak metamorfoze (engl. *metamorphic climax* - metamorfozni klimaks). Rep, koji je ključan za plivanje u stadijumu punoglavca, postepeno se resorbuje a hranljive materije iz repa se koriste za razvoj drugih delova tela. Sa razvojem pluća umesto škruga, bitna promena u cirkulatornom sistemu koja nastaje u procesu metamorfoze je razvoj trokomornog srca (dve pretkomore i jedna komora) što omogućava razdvajanje oksigenisane i dezoksigenisane krvi koje je neophodno za život na kopnu. Kada je čulo sluha u pitanju, u metamorfozi se razvija srednje uho (dolazi do razvoja timpanalne membrane (bubne opne) koja postaje funkcionalna), unutrašnje uho se reorganizuje (sakulus i lagena se funkcionalno reorganizuju i povećava se broj mehanoreceptora) a dolazi i do funkcionalnog prilagođavanja auditornog sistema na potpuno drugačiji medijum – vazduh (Kalezić i Tomović, 2007).

Etkin je 1932. godine definisao tri faze procesa metamorfoze: 1) Premetamorfoza – karakteriše se rastom i razvojem larvalnih struktura dok su bilo kakve metamorfne promene odsutne; od svih grupa vodozemaca ova faza je jedinstvena za žabe i traje od 26. do 30. Gosnerovog stadijuma (GS; Gosner, 1960); 2) Prometamorfoza – period rasta se nastavlja, posebno zadnjih ekstremiteta i iniciraju se minimalne metamorfne promene; prometamorfoza traje od 31. do 41. GS; 3) Metamorfozni klimaks – period radikalnih promena čiji vrhunac predstavlja gubitak najvećeg broja larvalnih karakteristika; kod žaba je početak ovog perioda praćen početkom resorpcije repa (42. Gosnerov stadijum - GS 42), a završava se kada se rep potpuno resorbuje (46. Gosnerov stadijum - GS 46) (Etkin, 1932).

1.2.2.1 Neuroendokrina regulacija metamorfoze

Hormoni usklađuju različite morfološke i fiziološke promene koje se dešavaju tokom metamorfoze. Aktivnost hipotalamo-hipofizno-tireoidne (engl. *Hypothalamic-pituitary-thyroid* - HPT) ose kod punoglavaca je regulisana na više nivoa i ona određuje kada će larve započeti proces metamorfoze i kojom će se brzinom metamorfoza odvijati. S obzirom na to da je hipotalamo-hipofizno-interrenalna (engl. *Hypothalamic-pituitary-interrenal* - HPI) osa blisko povezana sa HPT osom, nervni putevi odgovorni za prenošenje informacija o stresnim uslovima mogu takođe imati ključnu ulogu u regulisanju vremena metamorfoze.

U metamorfoznom klimaksu hipotalamus povećava proizvodnju kortikotropin oslobađajućeg hormona (engl. *Corticotropin-releasing hormone* - CRH) koji stimuliše proizvodnju hormona hipofize - tireostimulirajućeg (engl. *Thyroid-stimulating hormone* - TSH) i adrenokortikotropnog (engl. *Adrenocorticotrophic hormone* - ACTH) hormona. TSH stimuliše produkciju tireoidnog hormona (tiroksin, T₄ ili TH) koga luči štitasta žlezda, dok ACTH stimuliše

produkciju kortikosteroidnih hormona interrenalne žlezde. Aktivacija ove dve ose - HPT i HPI je neophodna za otpočinjanje procesa metamorfoze (Denver, 2009).

Tireoidni hormon je primarni hormon koji kontroliše metamorfozu vodozemaca i koji nezavisno od uticaja drugih hormona dovodi do morfoloških promena. Specifična tkiva vodozemaca pokazuju različitu osetljivost na različite doze TH (Buchholz i Hayes, 2005), i u zavisnosti od tkiva, TH može izazvati proliferaciju ćelija, ćelijsku smrt, diferencijaciju ili migraciju. Njegova koncentracija u krvnoj plazmi je u premetamorfozi niska (kada nema nikakvih morfoloških promena), dok raste u periodu prometamorfoze da bi dostigla svoj maksimum u metamorfoznom klimaksu kada se najbrže dešavaju najintenzivnije morfološke promene. Nakon metamorfoze koncentracija TH opada i dostiže nivo uobičajen za adultne jedinke.

Kortikosteroidi su primarni hormoni stresa kod kičmenjaka i proizvode se kao odgovor na različite signale iz okoline. Proizvodnja kortikosteroida se menja tokom razvoja i odražava funkcionalnu zrelost HPI ose. Kortikosteron (engl. *Corticosterone* - CORT) je jedan od glavnih kortikosteroida koga proizvode interrenalne žlezde kod vodozemaca. Kod mnogih vrsta dolazi do povećanja koncentracije CORT-a u krvnoj plazmi tokom metamorfoznog klimaksa, i ovo povećanje je više ili manje sinhronizovano sa povećanjem koncentracije TH u plazmi. CORT i TH u metamorfozi imaju sinergističko delovanje koje se ogleda u tome što CORT podstiče metamorfozu tako što povećava aktivnost TH jer se sa porastom oba ova hormona povećava ekspresija tireoidnih receptora i aktivnost enzima monodejodinaza (koji imaju ulogu da TH tj. T₄ prevedu u njegovu biološki aktivnu formu T₃) (Denver, 2009).

Kortikosteroidi mogu uticati na rast i razvoj punoglavaca, ali je njihov uticaj kompleksniji od uticaja TH. Različite studije su pokazale da uticaj CORT-a na metamorfozu punoglavaca zavisi od razvojnog stadijuma i statusa TH. Egzogeno dodat CORT punoglavcima koji su u premetamorfozi (GS 26-30) dovodi do inhibicije njihovog rasta i razvoja, dok dodavanje CORT-a u prometamorfozi (GS 31-41) inhibira rast ali ubrzava razviće kod najvećeg broja vrsta bezrepih vodozemaca (npr. Gómez Mestre i sar., 2013; Bagwill i sar., 2016; Denver, 2009; Denver, 2021).

1.3 Uticaj stresnih faktora na vodozemce

Brojnost različitih vrsta organizama, kao i broj vrsta u različitim carstvima, opada svakodnevno širom sveta zbog promena u životnoj sredini koje su uzrokovane kako prirodnim, tako i antropogenim globalnim uticajima (Strong i sar., 2017). Promene u korišćenju zemljišta, uzrokovane urbanizacijom i širenjem poljoprivrednih površina, hemijsko zagađenje, uvođenje invazivnih vrsta i klimatske promene, smatraju se glavnim uzrocima globalnih promena koje utiču na biodiverzitet i funkcionisanje ekosistema (Bernhardt i sar., 2017). Sve ove promene u ekosistemu predstavljaju izazove za sve organizme (Sala i sar., 2000) a posebno za one sa složenim životnim ciklusom kao što su vodozemci.

Zbog činjenice da vodozemci imaju složen životni ciklus koji podrazumeva naseljavanje dve ekološki različite životne sredine u različitim fazama života – akvatičnu i terestričnu – ova grupa je posebno osetljiva na promene sredine. Klimatske promene predstavljaju ozbiljnu pretnju za biodiverzitet vodozemaca. U poslednjih 100 godina, Zemlja se zagrejala za oko 0.74 °C, a očekuje se da će se globalna prosečna temperatura povećati za 4.3 ± 0.7 °C do 2100. godine (Pacifci i sar., 2015). Pored toga, pretpostavlja se da će u bliskoj budućnosti zakiseljavanje morskih i slatkovodnih ekosistema, kao i povećana učestalost ekstremnih klimatskih događaja, poput toplotnih talasa, suše

ili poplava (Palmer i sar., 2017) dodatno negativno uticati na brojnost vodozemaca. Od oko 8 000 vrsta poznatih vodozemaca, čak 40 % je na IUCN-ovoj listi klasifikovano kao ugroženo što ih čini najugroženijom grupom kičmenjaka na globalnom nivou. Ova klasifikacija podrazumeva različite kategorije ugroženosti poput ranjivih, ugroženih i kritično ugroženih vrsta. Od ovih 8 000 opisanih vrsta, 2 371 vrsta pripada grupi bezrepih vodozemaca od čega je oko 1 125 vrsta pod visokim rizikom od izumiranja po IUCN-u. Pored svih nabrojanih faktora koji negativno utiču na brojnost svih vodozemaca, ekstremno visoke temperature koje posledično dovode do isušivanja vodenih staništa najviše doprinose padu brojnosti vodozemaca na globalnom nivou. Da bi adekvatno odgovorili na sve ove promene, mnogi vodozemci moraju prilagoditi svoje osobine životne istorije, morfologiju, fiziologiju i ponašanje novonastalim uslovima. Jedan od načina na koji vodozemci povećavaju svoju sposobnost da se nose sa fluktuacijama u okruženju je da imaju plastičan odgovor u većini ovih osobina. Različiti faktori koji vladaju u staništu određuju koliki će biti intenzitet plastičnog odgovora i kako će to uticati na fitnes jedinki.

1.4 Odlike bezrepih vodozemaca (Anura) u uslovima isušivanja staništa

1.4.1 Složen životni ciklus bezrepih vodozemaca u uslovima isušivanja staništa

Isušivanje (desikacija) vodenih staništa je abiotički faktor koji najviše doprinosi padu brojnosti vodozemaca na globalnom nivou. Ženke najvećeg broja vrsta žaba polažu jaja u vode koje su različitog vremena trajanja – od malih privremenih voda koje nastaju i nestaju u relativno kratkom vremenskom periodu, do većih vodenih površina koje se zadržavaju tokom cele godine. Privremene male bare u kojima se voda zadržava samo nekoliko nedelja ili meseci i koje isušuju svake godine, su pod najvećim rizikom od isušivanja što predstavlja najveći ugrožavajući faktor za razvoj svih vodenih organizama. Jaja i larve svih vodozemaca su stoga izloženi promenljivim nivoima vode što je praćeno i povećanim rizikom od isušivanja, povećanom temperaturom vode, koncentracijom jona, dok sadržaj kiseonika opada. Povećava se i gustina populacije a samim tim dolazi i do pojačane kompeticije za hranu. Dodatno, može se javiti i povećani pritisak predatora. Zbog svega navedenog se očekuju strategije koje pomažu da se jedinke prilagode stalnim promenama u staništu, a koje podrazumevaju visoku fenotipsku plastičnost u osobinama životne istorije, morfologiji, fiziologiji i ponašanju.

Promenjeni uslovi u vodenom staništu, kao što je smanjenje nivoa vode, dovode do toga da punoglavci najvećeg broja vrsta žaba ubrzaju razviće (odnosno ispolje adaptivnu fenotipsku plastičnost) kako bi metamorfozirali što ranije (npr. Johansson i sar., 2005; Mogali i sar., 2017) i napustili vodeno stanište koje nestaje. Ovo ubrzanje razvića povećava verovatnoću preživljavanja a samim tim i ostavljanja potomstva u budućnosti, ali takođe uključuje i buduću cenu ispoljene plastičnosti koja je povezana sa manjom veličinom tela, manjom masom, stopom rasta, manjom količinom rezervnih masnih naslaga, smanjenom osetljivošću na parazite, smanjenom tolerancijom na dehidraciju, negativnim efektom na lokomotorne performanse, slabijim imunitetom itd. (npr. Gervasi i Foufopoulos, 2008; Mogali i sar., 2017; Newman i Dunham, 1994; Richter-Boix i sar., 2006a). Uprkos mnogim nabrojanim negativnim efektima ispoljene plastičnosti, ranija metamorfoza se favorizuje u privremenim vodenim staništima gde je smrtnost punoglavaca visoka usled isušivanja. Zbog toga se očekuje da je evolucija osobina životnih istorija išla u pravcu

povećanja adaptivne plastičnosti i balansirano raspoređivanja energije kako bi se ostvario maksimalan broj potomaka i povećala verovatnoća preživljavanja u ovakvom staništu (West-Eberhard, 2003), nasuprot favorizovanju fiksnih (neplastičnih) strategija koje onemogućavaju reagovanje na promene u staništu.

Životni ciklus vrsta porodice Scaphiopodidae predstavlja klasičan primer adaptacije osobina životne istorije na ekstremne klimatske uslove. Predstavnici porodice Scaphiopodidae naseljavaju sve pustinske regione Severne Amerike, a neke vrste se javljaju čak i u najsušnijim delovima tih pustinja. U skladu s tim uslovima, one imaju izuzetno kratak larvalni period. *Scaphiopus couchii* je poznat po najkraćem larvalnom periodu među bezrepim vodozemcima - metamorfoza se može dogoditi za svega 8 dana (Newman, 1987). Evolucija kratkog larvalnog perioda verovatno predstavlja adaptaciju na izbegavanje isušivanja u kratkotrajno postojećim pustinskim barama (Buchholz i Hayes, 2002). Druga srodna evropska vrsta *Pelobates cultripes* se razmnožava u trajnim barama, a njen larvalni period u prirodi može da traje od 4 do 6 meseci, pa čak i da uključuje prezimljavanje (Buchholz i Hayes, 2002), dok je larvalni period i trajanje vodenih staništa u kojima se razmnožava *Spea multiplicata* između *S. couchii* i *P. cultripes* (Morey i Reznick, 2000; Buchholz i Hayes, 2002). Iako se razdvajanje porodica Scaphiopodidae (rodovi *Scaphiopus* i *Spea*) i Pelobatidae (rod *Pelobates*) najverovatnije dogodilo pre više od 80 miliona godina, tokom krede, usled formiranja Atlantskog okeana, smatra se da je evolucija izrazitih razlika u dužini larvalnog perioda kod ovih žaba najverovatnije povezana sa aridifikacijom jugozapada Severne Amerike. Naime, selektivni pritisak za skraćanje larvalnog perioda verovatno nije postojao ranije, iako se ne isključuje mogućnost divergencije pre formiranja pustinja (Kulkarni i sar., 2011).

Filogenetske analize sugerišu da je prvobitni nivo razvojne plastičnosti kod današnje porodice Scaphiopodidae verovatno bio sličan onome koji se danas viđa kod roda *Pelobates* (Gómez Mestre i Buchholz, 2006). Stoga su autori (Gómez Mestre i Buchholz, 2006) predložili da je ubrzanje razvića kod roda *Scaphiopus* nastalo putem genetičke akomodacije iz prethodno prisutne plastičnosti, odnosno da je nasledna plastičnost omogućila preživljavanje u uslovima postepenog formiranja pustinja, čime se otvorila mogućnost za kasniju selekciju genotipova sa skraćenim larvalnim periodom. Međutim, sposobnost vrste *Scaphiopus couchii* da završi svoje razviće za samo 8 dana je povezana sa cenom ove plastičnosti koja podrazumeva manju veličinu tela u metamorfozi, kraće zadnje ekstremitete, izmenjen oblik glave, izmenjeno vreme diferencijacije gonada i nedostatak abdominalnih masnih tela (Buchholz i Hayes, 2002; Gómez Mestre i Buchholz, 2006; Kulkarni i sar., 2011). Sve ove osobine su konstitutivno izražene kod *S. couchii*, dok se kod *P. cultripes* i *S. multiplicata* javljaju samo kada su izložene niskom nivou vode.

1.4.2 Metamorfoza bezrepih vodozemaca u uslovima isušivanja staništa

Teorija osobina životnih istorija predviđa da je u stalno promenljivim (heterogenim) sredinama vreme metamorfoze vodozemaca najviše izloženo uticaju prirodne selekcije, zato što će, na primer, u vodama koje brzo isušuju jedinke redukovati svoj fitness ako ne dostignu specifičan stadijum (tj. ne metamorfoziraju u terestričnu formu) pre nego što stanište kompletno presuši. Vreme kada će jedinke metamorfozirati i veličina tela u metamorfozi su najvažnije osobine životne istorije jer su direktno povezane sa adaptivnom vrednošću jedinki.

Skraćanje vremena razvića (tj. ubrzanje razvića) u uslovima isušivanja često za posledicu ima i kraći period rasta što dovodi do manje veličine tela u metamorfozi i manje mase. Veličina tela i masa u metamorfozi su korelisane sa preživljavanjem, veličinom tela u adultnoj fazi, vremenom polnog sazrevanja i reproduktivnim uspehom mužjaka i ženki, drugim rečima, fitnessom jedinki (Newman, 1992; Altwegg i Reyer, 2003). Zbog toga je vreme metamorfoze od ključnog značaja za

sve osobine životne istorije i dinamiku populacija mnogih vrsta vodozemaca (Wilbur, 1980), a glavni izazov teorije osobina životne istorije je da objasni i predvidi varijabilnost u vremenu metamorfoze i veličini tela u procesu prelaska iz jedne životne faze u drugu (Wilbur i Collins, 1973; Roff, 1980; Stearns, 1992; Berrigan i Koella, 1994).

Zbog svega navedenog jasno je da se vodozemci suočavaju sa *trade-off*-om između vremena metamorfoze/veličine tela i preživljavanja (Rudolf i Rödel, 2007). Istraživači su razvili nekoliko modela kako bi se vreme metamorfoze vodozemaca što tačnije pretpostavilo.

1.4.2.1 Modeli o optimalnom vremenu metamorfoze kod bezrepih vodozemaca

Nekoliko modela je razvijeno u poslednjih 40-ak godina kako bi se što tačnije pretpostavilo vreme metamorfoze kod vodozemaca (Wilbur i Collins, 1973; Smith-Gill i Berven, 1979; Travis, 1984; Werner, 1986; Rowe i Ludwig, 1991). Obično se ovi modeli zasnivaju na maksimiziranju rasta ili optimalnoj ravnoteži između maksimiziranja rasta i minimiziranja smrtnosti (Wilbur i Collins, 1973; Werner, 1986). Kasniji modeli su proširili ove pristupe pretpostavljajući da se larve mogu prilagoditi uslovima sredine samo u ranim fazama larvalnog perioda, ali ne mogu reagovati na promene u uslovima sredine nakon određenog praga starosti (Travis, 1984; Reznick, 1990; Hensley, 1993; Leips i Travis, 1994). Iako su razvijeni za vodozemce, ovi modeli se mogu primeniti na različite grupe organizama (npr. ribe: Reznick, 1990; insekti: Bradshaw i Johnson, 1995).

Najšire prihvaćen, najviše citiran i potvrđen u mnogim eksperimentima je Wilbur-Kolinsov model optimizacije metamorfoze vodozemaca (Wilbur i Collins, 1973). Wilbur i Kolins (1973) su predložili da i trajanje larvalnog perioda i veličina tela pri metamorfozi zavise od stope rasta larvi. Njihov model tvrdi da postoji minimalna veličina tela (b) pri kojoj je moguće pokrenuti metamorfozu, i maksimalna veličina tela ($b + c$) pri kojoj je početak metamorfoze obavezan. Između ove dve veličine, metamorfoza se pokreće kada stopa rasta punoglavca (zavisna od mase) padne ispod određenog nivoa (g) (Wilbur i Collins, 1973; Collins, 1979). Prema ovom modelu, sredinski faktori utiču na veličinu tela i vreme metamorfoze tako što menjaju individualne stope rasta. Nedostatak hrane u vodenom staništu i/ili isušivanje staništa su dva najčešća faktora koja utiču na larve da metamorfoziraju ukoliko su postigle kritičnu minimalnu veličinu tela za metamorfozu. Započinjanje metamorfoze je adaptivno kada je rizik metamorfoze (tj. prelazak u terestričnu sredinu) manji od rizika ostajanja u akvatičnoj sredini. Akvatična i terestrična faza su međusobno zavisne i uslovi u staništu koji vladaju za vreme akvatične faze jedinki direktno su povezani sa osobinama životne istorije, morfološkim i fiziološkim osobinama jedinki u terestričnoj fazi životnog ciklusa. Drugim rečima, metamorfoza je određena balansom između dostupnosti hrane u akvatičnoj sredini i mortaliteta u terestričnoj sredini (Wilbur i Collins, 1973). Zbog toga što larvalnu fazu prati povećan unos hrane i ubrzan rast, ranija metamorfoza može rezultovati malim, slabo uhranjenim juvenilcima što će imati prenosne efekte (engl. *carry-over effects*) na buduću fitnes. Niža stopa preživljavanja, lošija otpornost na parazite, lošija tolerancija na gubitak vode, negativni efekti na lokomotorne performanse punoglavaca (dužina repa) a zatim adultnih jedinki (dužina prednjih i zadnjih ekstremiteta i širina glave), reproduktivni uspeh i imunitet (npr. Newman i Dunham, 1994; Richter-Boix i sar., 2006a; Gómez Mestre i sar., 2013; Johansson i sar., 2016), su neki od najčešće ispoljenih negativnih efekata ubrzanog razvića punoglavaca usled isušivanja staništa koji se prenose na juvenilnu/adultnu fazu.

Na osnovu ovog modela, Kolins (Collins, 1979) je predvideo da će, ako je dostupnost hrane ograničena, varijacije u individualnim stopama rasta dovesti do pozitivne korelacije između veličine tela u metamorfozi i trajanja larvalnog perioda. Kada je kompeticija intenzivna, prvi punoglavci

koji dostignu minimalnu veličinu tela za metamorfozu će imati niske stope rasta i metamorfozirajuće rano. Punoglavci koji kasnije dostignu minimalnu veličinu tela biće u manjoj kompeticiji za hranu i mogu dostići veću veličinu tela pre nego što započnu metamorfozu. Travis (1984) je testirao ovu pretpostavku koristeći punoglavce vrste *Hyla gratiosa* koje su bile pojedinačno gajene sa inicijalno fiksnim nivoom hrane po jedinki. Kada bi punoglavci iz određene grupe metamorfozirali, on bi ravnomerno podelio njihovu nepojedenu hranu preostalim larvama, simulirajući time povećanje dostupnosti hrane povezano sa smanjenom kompeticijom. Kombinacija niskog početnog nivoa hrane i smanjivanje kompeticije dovela je do predviđene korelacije između veličine tela i vremena metamorfoze, podržavajući Vilbur-Kolinsov model. Iako je povećana količina hrane značajno uticala na veličinu tela pri kojoj punoglavci metamorfoziraju, nije imala uticaja na trajanje larvalnog perioda u poređenju sa punoglavcima koji su dobijali nepromenjene *per capita* količine hrane. Ovaj rezultat nije u skladu s Vilbur-Kolinsovim modelom. Travis (1984) je zaključio da je razvojni tempo kod *Hyla gratiosa* fiksiran rano tokom larvalnog perioda, što onemogućava kasnije promene u stopama rasta kao reakciju na promenljive uslove staništa. Više laboratorijskih istraživanja pokazalo je da kod različitih vrsta žaba zaista dolazi do fiksiranja brzine razvoja, ali u mnogo kasnijoj fazi nego što se prvobitno mislilo (npr. Leips i Travis, 1994; Beachy i sar., 1999). U ovim istraživanjima, fiksiranje brzine razvoja, desilo se otprilike istovremeno s početkom prometamorfoze (tj. početkom diferencijacije prstiju) i obuhvatalo je poslednju trećinu ukupnog razvića. Stoga su Leips i Travis (1994) modifikovali Travisov model metamorfoze i formulisali “dinamički model alokacije resursa”. Prema ovom modelu brzina razvića se može adaptivno prilagoditi uslovima sredine tokom prve polovine razvića, ali se fiksiranje brzine razvića javlja najkasnije od prometamorfoze, tj. promene u okruženju tada utiču samo na rast punoglavaca ali ne i na brzinu razvoja.

Pored sposobnosti punoglavaca da ispolje plastičnost u vremenu metamorfoze i veličini tela prilikom isušivanja staništa, isušujući uslovi takođe uzrokuju promene u neuroendokrinim putevima koji su i odgovorni za iniciranje metamorfoze u stresnim uslovima.

1.4.2.2 Neuroendokrini regulacija metamorfoze u uslovima isušivanja staništa

Promene u nivou vode koje hipotalamus punoglavaca može da detektuje dovode do povećane proizvodnje CRH, što zatim stimuliše proizvodnju hormona hipofize koji aktiviraju tireoidnu i interrenalnu žlezdu (Denver, 1997; Kikuyama i sar., 1993). Aktivacija HPT i HPI ose rezultira povećanim nivoima TH i CORT-a. (Denver, 1997; Boorse i Denver, 2003). Povećan sadržaj ovih hormona ubrzava larvalni razvoj i morfogenezu, omogućavajući punoglavcima da metamorfoziraju ranije (Denver, 2009; Gómez Mestre i sar., 2013). Veliki broj studija na različitim vrstama bezrepih vodozemaca potvrdio je ubrzano razviće u uslovima isušivanja (npr. Newman, 1989; Márquez-García i sar., 2009; Gómez Mestre i sar., 2013; Enriquez-Urzelai i sar., 2013; Charbonnier i Vonesh, 2015; Lent i Babbitt, 2020). TH je primarni morfogen, i dovoljan je da pokrene metamorfozne promene u svim tkivima (Dodd i Dodd, 1976; Das i sar., 2010), dok efekat CORT-a zavisi od stadijuma razvića punoglavaca i nivoa TH. Koncentracija TH i CORT-a je niska u ranim, premetamorfnim stadijumima razvoja punoglavaca. U premetamorfozi je intenzivan rast punoglavaca kako bi što pre dostigli minimalnu veličinu tela neophodnu za početak metamorfoze, dok se koncentracija TH i CORT-a povećava tokom prometamorfoze sa maksimalnim nivoima u metamorfoznom klimaksu (GS 42 – GS 45) (Dodd i Dodd, 1976; Denver, 2009; Denver, 2021). Dakle, kraći larvalni periodi pod isušujućim uslovima staništa posledica su povećane proizvodnje TH i CORT-a putem aktiviranja rada HPT i HPI ose, što dovodi do ubrzanog razvića (Denver, 2013). Međutim, dok povećani nivoi TH i CORT-a kod najvećeg broja vrsta žaba dovode do

ubrzanog razvića, istraživanja su pokazala da na primer vrsta *Scaphiopus couchii* ne ubrzava uvek razviće u uslovima isušivanja staništa. Kod ove vrste bazalni nivoi TH i CORT-a su visoki bez obzira na to da li su jedinke izložene niskom ili visokom nivou vode. Odnosno, nivoi ovih hormona se ne menjaju u isušujućim uslovima staništa što je suprotno u odnosu na vrste koje ubrzavaju razviće. Ove promene i mehanizmi u endokrinnoj regulaciji HPT i HPI ose (Kulkarni i sar., 2017) kod vrsta koje ne mogu da ubrzaju razviće u uslovima isušivanja staništa su nedovoljno istraženi.

Dugotrajnija izloženost povećanim nivoima CORT-a može uticati na mnoge osobine koje su direktno povezane sa fitnessom, kao što su smanjene stope rasta, negativan uticaj na rast i razvoj repa, tela i zadnjih ekstremiteta (npr. Hayes i sar., 1993; Hayes, 1995). Takođe se skraćuje životni vek putem pojačane produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (Johnson i sar., 2013; Gómez Mestre i sar., 2013).

1.4.3 Plastičnost u morfološkim strukturama punoglavaca i juvenilnih jedinki bezrepih vodozemaca u uslovima isušivanja staništa

Metamorfoza predstavlja ekstreman proces preoblikovanja struktura kod punoglavaca prilikom prelaska iz akvatične u terestričnu sredinu. Ovaj proces uključuje značajne morfološke promene, kao što su zamena škrge plućima, resorpcija repa koji je bio ključan za kretanje u vodi i razvoj ekstremiteta za kretanje na kopnu. Takve transformacije omogućavaju jedinkama prilagođavanje novim zahtevima kopnenog okruženja, gde su potrebne drugačije fiziološke i morfološke karakteristike za preživljavanje i uspešno funkcionisanje. Iako se ranije smatralo da proces metamorfoze prekida razvojne i genetičke veze između osobina koje su funkcionalne u različitim fazama razvića (prikazano u Ebenman, 1992; Moran, 1994), čime se omogućavalo da se larvalna i juvenilna faza nezavisno prilagode svojim odgovarajućim sredinama, sve manje rezultata na vodozemcima ide u prilog ovoj hipotezi o adaptivnom razdvajanju (Watkins, 2001). Prema ovoj hipotezi pretpostavlja se da osobine koje su važne u larvalnoj fazi mogu evoluirati u pravcu optimizacije funkcionalnosti u akvatičnom okruženju, dok se osobine važne za odrasle jedinke prilagođavaju potrebama terestričnog okruženja nezavisno od pređašnjih larvalnih karakteristika (Moran, 1994).

Sam proces metamorfoze podrazumeva drastične promene na svim nivoima organizacije, a stresni faktori koji mogu uticati na razvoj jedinki tokom larvalnog perioda još više doprinose povećanju morfološke varijabilnosti. Usled intenzivnih klimatskih promena kojima su izloženi svi organizmi a posebno vodozemci zbog složenog životnog ciklusa, isušivanje staništa kao posledica povećanja temperature se izdvaja kao abiotički faktor koji najviše doprinosi padu njihove brojnosti. Pri isušivanju vodenog staništa najveći broj vrsta žaba ima sposobnost da ubrza svoje razviće i metamorfozira što pre kako bi izbegle smrtnost usled suše. Međutim, ova adaptivna plastičnost u razviću može negativno uticati na morfološke osobine punoglavaca a posledično i juvenilnih/adultnih jedinki usled prenosnih efekata na terestričnu fazu.

Najveći broj studija je utvrdio da ubrzano razviće indukovano isušivanjem staništa dovodi do najizraženijih promena u obliku repa, dužini tela i masi tela. Repna peraja punoglavaca odgajanih u uslovima isušivanja staništa su uža i kraća u odnosu na jedinke gajene u konstantnim vodenim uslovima (Richter-Boix i sar. 2006a, 2006b; Van Buskirk, 2009, Gómez i Kehr, 2019). Objašnjenje za ovakvu morfologiju repa jedinki odgajanih u uslovima isušivanja staništa je da se funkcija repnog peraja menja u zavisnosti od dela vodenog stuba u kojem se punoglavci kreću. U stalnim vodama koje ne isušuju repna peraja pomažu punoglavcima da zadrže stabilnost prednjeg dela tela dok se kreću jer punoglavci ovih vrsta provode više vremena na različitim dubinama. Međutim, kod privremenih voda koje često isušuju, punoglavci naseljavaju bentos i provode većinu

vremena na dnu bara i relativno malo vremena u vodenom stubu. Zbog toga, punoglavci koji žive u privremenim, plitkim barama često imaju rep bez peraja i spljošteno telo – oblik koji im više odgovara u promenljivim uslovima plićih voda (Richter-Boix i sar. 2006a, 2006b). Van Buskirk i Saxer (2001) su u svojoj studiji dali alternativno objašnjenje za ovu adaptivnu morfologiju repa po kome se smatra da se rep bez peraja može brže resorbovati kod punoglavaca tokom metamorfoze jer trajanje metamorfoze zavisi od količine tkiva koje treba da se resorbuje. Downie i saradnici (2004) su utvrdili da postoji značajna korelacija između trajanja metamorfoze i dužine repa kod nekoliko vrsta žaba što dodatno potvrđuje ovo objašnjenje.

Gómez i Kehr (2019) su u svojoj studiji ispitivali kako različita veličina vodenog staništa (odnosno razlike u dubini i površini vode) utiče na morfologiju, rast i razvoj punoglavaca. Kombinujući dve različite dubine i dve različite vodene površine, autori su zaključili da ove dimenzije staništa imaju različit uticaj na fenotipsku plastičnost punoglavaca tokom razvića. Na ranim ontogenetskim stadijumima, dubina vode ima veći uticaj na razvoj jedinki. U kasnijim fazama, međutim, površina vode postaje ključni faktor. Kada je dubina vode smanjena, punoglavci razvijaju kraći trup i rep, a njihovo vreme do dostizanja metamorfoze je produženo. Ovo je u suprotnosti sa nalazima većine drugih studija, gde punoglavci u uslovima isušivanja ubrzavaju razviće. S druge strane, smanjenje vodene površine dovelo je do ubrzanog razvića. Punoglavci su u tim uslovima razvili duži trup, bez promena u dužini repa. Izostanak u promeni dužine repa iako je duži trup, može predstavljati adaptaciju jer omogućava bržu resorpciju repa i raniju metamorfozu.

Isušivanje staništa kod najvećeg broja vrsta koje ubrzavaju svoje razviće u ovakvim uslovima negativno utiče na dužinu i masu tela jedinki (Denver i sar., 1998; Enriquez-Urzelai i sar., 2013; Richter-Boix i sar., 2006a; Lent i Babbitt, 2020). Usled ubrzanog razvića i energije koja se ulaže da se što pre završi proces metamorfoze i jedinke pređu u terestrične uslove, jedinke imaju manje vremena da usvoje hranljive materije i kao posledicu toga imaju manju dužinu i masu tela.

Sve ove promene u morfologiji na larvalnom stadijumu mogu imati prenosne efekte na terestričnu fazu jedinke, posebno ako uslovi koji vladaju za vreme larvalne faze utiču na fitnes i lokomotorne performanse metamorfoziranih jedinki. Ova činjenica još više ističe važnost izučavanja uticaja nekog stresora na više životnih faza. Watkins (2001) je u svojoj studiji ispitao genetičke korelacije između ekvivalentnih larvalnih i adultnih karaktera, odnosno lokomotornih performansi, i otkrio veće fenotipske korelacije između nego unutar faza. Pored toga, pronađene su korelacije između morfologije repnog peraja i morfologije prednjih i zadnjih ekstremiteta adultnih jedinki (Van Buskirk i Saxer, 2001). S obzirom na to da isušivanje staništa utiče na dužinu i oblik repnog peraja, ove promene u morfologiji repa mogu negativno uticati na dužinu elemenata prednjih i zadnjih ekstremiteta. Dužine elemenata prednjih i zadnjih ekstremiteta direktno utiču na lokomotorne sposobnosti jedinki, od kojih zavisi beg od predatora, potraga za plenom i širenje areala, što sve utiče na fitnes jedinki. Zadnji ekstremiteti imaju ulogu u generisanju energije potrebne za skok, dok prednji ekstremiteti održavaju ravnotežu prilikom doskoka i ublažavaju posledice kontakta sa podlogom (Nauwelaerts i Aerts, 2006, Petrović, 2020). Richter-Boix i sar., (2006a) i Charbonnier i Vonesh (2015) su u svojim studijama pokazali da isušivanje staništa negativno utiče na dužinu i razvijenost mišića zadnjih ekstremiteta zbog smanjene stope rasta usled ubrzanja razvića što se negativno odrazilo i na sposobnost skakanja jedinki ovih vrsta u poređenju sa jedinkama gajenim u konstantnom vodenom tretmanu. Takođe, Márquez-García i sar. (2009) su na jedinkama gajenim u isušujućim uslovima dobili iste rezultate kada je dužina ekstremiteta u pitanju, mada nisu ispitivali skakačke performanse. Pored negativnog efekta na dužinu ekstremiteta, isušivanje staništa je imalo i negativne efekte na širinu glave metamorfoziranih jedinki ali i na dužinu (Richter-Boix i sar. 2006a) što se odražava na veličinu plena koju ove jedinke mogu da savladaju.

Svi prethodno nabrojani primeri su vezani za studije koje su istraživale efekat isušivanja staništa na morfološke osobine vrsta koje imaju sposobnost da ispolje adaptivnu plastičnost u razviću u ovakvim uslovima. Sa druge strane, generalno postoji mali broj studija koji je istraživao efekat isušivanja staništa na morfološke osobine vrsta koje nemaju ili su vremenom izgubile sposobnost ubrzanja razvića u uslovima isušivanja. Tako su na primer Hernández-Herrera i sar. (2019) kod vrste koja nije ubrzala razviće u uslovima isušivanja utvrdili da su ovakvi uslovi negativno uticali na dužinu tela i širinu glave punoglavaca što je posledično dovelo i do manje dužine tela metamorfoziranih jedinki kao i kraćih prednjih i zadnjih ekstremiteta (Hernández-Herrera i sar., 2019). Kod jedinki žutotrbog mukača poreklom iz efemernih i permanentnih voda gajenih u uslovima isušivanja staništa koje nisu ubrzale svoje razviće, pokazano je da su ovakvi uslovi negativno uticali na dužinu tela, kondicioni indeks i lokomotorne performanse metamorfoziranih jedinki što je bilo izraženije kod jedinki iz efemernih voda. Međutim, pojedinačne morfološke osobine nisu merene u ovom eksperimentu (Sinsch i sar., 2020).

Zbog svega navedenog, jasno je koliko je važno istraživati uticaj isušivanja staništa na morfološke osobine jedinki, jer promene u morfologiji imaju neposredan uticaj na fitnes jedinki.

1.4.4 Plastičnost u antioksidacionom zaštitnom sistemu bezrepih vodozemaca u uslovima isušivanja staništa

Antioksidaciona zaštita je fiziološki proces koji u zdravom organizmu neprekidno funkcioniše kako bi sprečio štetne efekte slobodnih radikala. Ova zaštita se ostvaruje kroz antioksidacioni sistem (AOS), prisutan kod svih aerobnih organizama, s ciljem da ograniči ili popravi oštećenja izazvana slobodnim radikalima. Slobodni radikali, poput reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i azota (RNS), zbog nesparenih elektrona, reaguju sa stabilnim molekulima, izazivajući lančane reakcije koje menjaju biomolekule. Faktori poput visokoenergetskog zračenja, teških metala, pesticida (Dröge, 2002), i efekti globalnog zagrevanja, poput visokih temperatura i isušivanja vodenih staništa (Petrović i sar., 2021), mogu doprineti njihovom stvaranju.

Kod vodozemaca, u toku procesa metamorfoze prilikom aktivacije HPT ose, dolazi i do modifikacija oksidacionog metabolizma usled velikih promena na svim nivoima organizacije uključujući i *de novo* razviće struktura za život u terestričnim uslovima. Reaktivne kiseonične i azotne vrste imaju bitnu regulatornu ulogu u procesu metamorfoze (Johnson i sar., 2013; Burraco i sar., 2017). ROS aktiviraju puteve povezane sa apoptozom koja je u osnovi resorpcije repa i remodelacije gastrointestinalnog trakta (Hanada i sar., 1997; Kashiwagi, 1999). Ukoliko se naruši balans između produkcije ROS-a/RNS-a i antioksidacionog sistema u korist ROS/RNS dolazi do oksidacionog stresa (Halliwell i Gutteridge, 1999). Oksidacioni stres remeti stukturu i funkcionisanje biomolekula (masti, proteina i DNK), a reakcija slobodnih radikala zavisi od njihove prirode, mesta nastanka i izvora (Sies i sar., 1985). Oksidaciono oštećenje ćelijskih membrana, lipida, lipoproteina i drugih lipidnih molekula, poznato kao lipidna peroksidacija, uzrokuje promene u propustljivosti ćelijske membrane i metabolizmu membranskih proteina i lipida. Oksidacioni stres pored direktnih efekata na normalno funkcionisanje ćelija, tkiva i organa može da ima efekte i na stopu preživljavanja, reproduktivni uspeh i dužinu života (Costantini, 2024).

Isušivanje vodenih staništa posebno pogađa vodozemce zbog njihove polupropustljive kože i složenog životnog ciklusa koji direktno zavisi od vode i spoljašnje temperature. Stresni uslovi, zajedno sa unutrašnjim promenama uzrokovanim razvojem mogu se odraziti na oksidacioni status i dovesti do stanja oksidacionog stresa (Halliwell i Gutteridge, 1999). Osnovu antioksidacionog

sistema čine antioksidansi – supstance koje, čak i u malim koncentracijama mogu da spreče ili smanje oksidaciju supstrata (Halliwell i Gutteridge, 1999).

Antioksidacioni sistem se sastoji od enzimskih i neenzimskih komponenti. Ključnu ulogu u primarnoj antioksidacionoj zaštiti imaju enzimi superoksid dimutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation-peroksidaza (GSH-Px). Među neenzimskim komponentama glutation (GSH) ima višestruku ulogu, pored direktne eliminacije ROS takođe je uključen i u regulaciju glutation zavisnog sistema. Katalaza je enzim prisutan kod gotovo svih prokariotskih i eukariotskih organizama izloženih molekulsom kiseoniku, a njena uloga je katalizovanje razgradnje vodonik-peroksida u vodu i kiseonik (Chelikani i sar., 2004). Glutation-peroksidaza je široko rasprostranjena u biljnom i životinjskom svetu, prisutna u citosolu, mitohondrijama, peroksizomima i intermembranskom prostoru gotovo svih ćelija, i katalizuje redukciju vodonik-peroksida u vodu i organskih hidroperoksida u alkohole koristeći glutation kao kofaktor. Iako oba enzima uklanjaju povišene koncentracije vodonik-peroksida, GSH-Px ima veći afinitet nego katalaza i igra važnu ulogu u primarnoj odbrani pri niskim koncentracijama vodonik-peroksida, dok katalaza postaje značajna pod uslovima izrazitog oksidacionog stresa (Kruidenier i Verspaget, 2002). Glutation je najzastupljeniji neproteinski tiol u ćelijama, brzo reaguje s reaktivnim vrstama kiseonika i azota, direktno uklanja slobodne radikale i učestvuje u direktnoj popravci oksidacionih oštećenja DNK molekula (Kruidenier i Verspaget, 2002).

Svi ovi navedeni antioksidacioni parametri imaju značajnu ulogu u odbrani ćelijskih struktura bezrepih vodozemaca u stresnim uslovima zbog čega su promene u njihovim aktivnostima/koncentracijama važne za utvrđivanje odgovora na fiziološki stresu desikacionim uslovima. Kao što je već navedeno u prethodnom tekstu, iako ubrzano razviće u desikaciji omogućava raniju metamorfozu i povećava verovatnoću preživljavanja, pored negativnih efekata na osobine životne istorije i morfološke osobine, ostavlja negativne posledice i na antioksidacioni sistem jedinki (Burraco i sar., 2017; Prokić i sar., 2021; Petrović i sar., 2021). Na primer, kod vrste *Pelobates cultripes* ubrzana metamorfoza usled desikacije dovodi do promena u oksidacionom statusu, što se ogleda u povećanim aktivnostima antioksidacionih enzima katalaze, superoksid-dismutaze i glutation peroksidaze (Gómez Mestre i sar., 2013). Oksidacioni stres može biti neizbežna posledica ubrzanog razvića kod punoglavaca, jer ubrzanje razvića zahteva i pojačane fiziološke i metaboličke napore (Mittler, 2002; Costantini, 2008; Gómez Mestre i sar., 2013; Burraco i sar., 2017). Međutim, u ovom eksperimentu istraživači nisu pronašli oksidaciona oštećenja (prisustvo lipidnih peroksida) kod jedinki *Pelobates cultripes* iz isušujućeg tretmana. Ovo sugeriše da je povećana aktivnost antioksidanasa bila dovoljna da neutrališe oksidaciona oštećenja kod ove vrste (Gómez Mestre i sar., 2013).

U radu Petrović i sar. (2021) ispitane su fiziološke promene u antioksidacionom sistemu larvi žutotrbog mukača u tri faze metamorfoze: na početku (GS 42), u sredini (GS 44) i na kraju (GS 46). Autori su takođe ispitivali kako isušujući uslovi utiču na AOS i oksidaciona oštećenja tokom ovih faza. Rezultati su pokazali da larve koje su se razvijale pod stresom isušivanja ispoljavaju veći stepen oksidativnih oštećenja u srednjoj i kasnoj fazi metamorfoze. Ove jedinke su imale niže nivoe glutationa u fazama GS 44 i GS 46, kao i snižene vrednosti enzima antioksidacione odbrane – katalaze, glutation-peroksidaze, glutation S-transferaze i sulfhidrilnih grupa u fazi GS 46, u poređenju sa kontrolnom grupom. Gladovanje usled remodelovanja gastrointestinalnog sistema tokom procesa metamorfoze remeti sintezu glutationa i proteina bogatih cisteinom, jer njihova sinteza zavisi od unosa hrane koji je fiziološki onemogućen (De Block i Stoks, 2008). Autori pretpostavljaju da je slabiji odgovor AOS posledica preusmeravanja energije sa energetski zahtevne antioksidacione zaštite ka procesima neophodnim za preživljavanje. Jedinke izložene stresu isušivanja nisu ubrzale razviće, imale su manju dužinu tela i slabiji antioksidacioni odgovor. Ovo ukazuje na oslabljeni odbrambeni sistem koji nije uspeo da se izbori sa povećanom proizvodnjom reaktivnih kiseoničkih vrsta (ROS). Na kraju metamorfoze (GS 46), jedinke iz grupe sa isušujućim

uslovima su morale da ulože dodatnu energiju u odnosu na kontrolne jedinke, i kao posledica toga, vrednosti ostalih parametara AOS su dodatno opale. Ovi nalazi ukazuju da su larve žutotrbož mokača koje su izložene isušivanju podložnije oksidacionim oštećenjima, što može negativno uticati na njihovo razviće i preživljavanje u uslovima smanjene dostupnosti vode.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Fenotipska plastičnost je važna za vrste sa složenim životnim ciklusom kao što su vodozemci, jer se neprestano suočavaju sa promenama u dve sredine (akvatičnoj i terestričnoj) i modifikuju osobine životne istorije, morfologiju i fiziologiju kako bi se što bolje prilagodili novim uslovima. Klimatske promene ugrožavaju opstanak vodozemaca na globalnom nivou, prvenstveno kroz negativan uticaj na vodena staništa koja su ključna za njihov složeni životni ciklus. Porast globalne temperature, neujednačenost atmosferskih padavina, ekstremne vrednosti klimatskih parametara, produženi periodi suše i povećano isparavanje, ubrzavaju isušivanje močvara, bara, jezera i drugih vodenih ekosistema, zbog čega su vodena staništa među prvima izložena negativnim posledicama klimatskih promena. Posebno su pogođene one vrste koje naseljavaju vode koje periodično isušuju, jer bez dovoljno vlage i vode, razviće njihovih larvi postaje ugroženo, što direktno doprinosi opadanju brojnosti populacija na lokalnom i globalnom nivou. Edukacija i podizanje svesti o važnosti očuvanja vodenih staništa a samim tim i vodozemaca su ključni koraci u smanjenju globalnog pritiska na ovu osetljivu grupu. I baš iz tog razloga su bitne studije koje izučavaju direktni efekat isušivanja staništa na vodozemce. Razumevanje uticaja isušivanja staništa na vodozemce od suštinskog je značaja za oblikovanje ciljanih konzervacionih strategija i dugoročnu zaštitu njihovih populacija.

Glavni cilj ove disertacije je utvrđivanje i kvantifikacija varijabilnosti u osobinama životne istorije, morfološkim i fiziološkim osobinama žutotrbug mukača (*B. variegata*) u uslovima isušivanja staništa. U okviru glavnog cilja definisani su sledeći specifični ciljevi:

1. Utvrditi da li će isušivanje staništa dovesti do ispoljavanja adaptivne fenotipske plastičnosti, tj. ubrzanja razvića žutotrbug mukača (kao što predviđa Wilbur-Kolinsov model o optimalnom vremenu metamorfoze (Wilbur i Collins, 1973)).
2. Utvrditi na koji način isušivanje staništa utiče na osobine životne istorije, morfološku varijabilnost i lokomotorne sposobnosti metamorfoziranih jedinki.
3. Utvrditi da li postoji određeni period u razviću žutotrbug mukača kada je vrsta najosetljivija na isušivanje staništa (kao što predviđa Travisov model o optimalnom vremenu metamorfoze (Travis, 1984)).
4. Utvrditi na koji način isušivanje staništa utiče na nivo hormona stresa kortikosterona i kako promene u nivou kortikosterona utiču na brzinu razvića, druge osobine životne istorije, morfologiju i fiziološki status metamorfoziranih jedinki.

3. MATERIJAL I METODE

Terenska istraživanja obuhvatala su sakupljanje jaja žutotrbug mukača na teritoriji Nacionalnog parka „Fruška gora“. Sakupljanje jaja iz prirodnih populacija za prvu godinu eksperimenta je omogućeno uz dozvolu Ministarstva zaštite životne sredine Republike Srbije (dozvola br. 353–01-83/2019–04). Eksperimentalni dizajn odobrila je Etička komisija Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu (dozvola br. 04–5/19) (PRILOG 1). Za drugu i treću godinu eksperimenta jaja su sakupljena na istom području uz dozvolu istog ministarstva (dozvola br. 353-01-2876/2019-04 za II godinu eksperimenta; dozvola br. 353-01-2716/2020-04 za III godinu eksperimenta). Eksperimentalni dizajn druge i treće godine je takođe odobren od strane Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede (dozvola br. 323-07-08393/2020-05/4 za II godinu eksperimenta; dozvola br. 323-07-03971/2021-05 za III godinu eksperimenta; PRILOG 2 i 3). 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 Objekat istraživanja

3.1.1 Opšte karakteristike roda *Bombina*

Rod *Bombina* Oken, 1816., pripadnik porodice Bombinatoridae Gray, 1825., u okviru reda Anura u najvećoj meri naseljava Evroazijski region. Vrste ove porodice se odlikuju velikim brojem filogenetski pleziomorfni osobina (između ostalih to su karakteristike larvi, morfologija, ingvinalni ampleksus). Jezik im je celom donjom površinom srastao za dno usne duplje i oblika je diska po čemu je naziv ove porodice po ranijoj klasifikaciji bio Discoglossidae. Zenica oka im je vertikalna ili srcolika (Duellman i Trueb, 1994). Vrste roda *Bombina* se odlikuju aposematskom obojenošću i kada su ugrožene pokazuju upozoravajući “*Unken refleks*”. Na ovaj način ističu svoje intenzivno obojene ventralne delove tela. Takođe, sekreti njihovih kožnih žlezda su za potencijalne predatore iritirajući i odbijajući (Simonović i sar., 2004). Rod *Bombina* broji tri vrste: *Bombina bombina*, *Bombina variegata* i *Bombina orientalis*. Prve dve vrste naseljavaju Evroazijski region dok se *B. orientalis* može naći samo u jednom delu Azijskog kontinenta. Vrste *B. bombina* i *B. variegata* su dve filogenetski najrodnije vrste unutar roda.

3.1.2 Opšte karakteristike žutotrbug mukača (*Bombina variegata*)

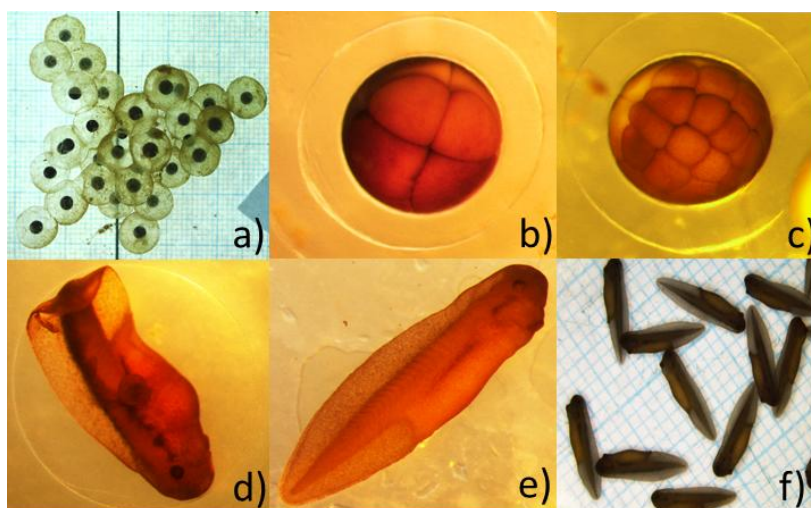
Jedinke žutotrbug mukača (*B. variegata*) su male, obično manje od 5 cm. Bradavice dorzalne strane tela su jasno izražene, sa najčešće crnim, istaknutim trnolikim završetkom. Dorzalna strana tela je siva, braon, žuta ili tamno-zelena. Osnovna boja ventralne strane je sivo-plava sa velikim žuto-narandžastim poljima koja po pravilu pokrivaju više od 50 % površine stomaka (**Slika 2.**). Prsti prednjih (naročito prvi prst) i zadnjih ekstremiteta su svetlo obojeni (Simonović i sar., 2004). Ova vrsta se može naći u malim mutnim privremenim vodama sa malo vegetacije, terestričnija je

u odnosu na crvenotrbog mukača, ima deblju kožu i reprodukuje se više puta u toku godine uglavnom posle velike količine padavina (od proleća do ranog leta). Mužjaci ne pokazuju teritorijalno ponašanje, imaju tiši poziv za parenje u odnosu na *B. bombina* i poseduju nuptijalne jastučice na palčevima koji dolaze do izražaja tokom reproduktivnog perioda i pomažu lakšem i čvršćem držanju ženke (Szymura, 1993).



Slika 2. Izgled žutotrbog mukača (*B. variegata*) (foto: A. Radmilović i A. Urošević).

B. variegata polaže jaja u vode različitog trajanja: od malih, osunčanih privremenih voda gde se uslovi staništa menjaju nepredvidivo u toku jedne i/ili više sezona, uglavnom usled klimatskih promena ili ljudskih aktivnosti (npr. polaže jaja i u udubljenja u zemlji nastala prolaskom vozila, koja se napune vodom nakon obilnih kiša) (Barandun i Reyer, 1997a), pa do stalnih voda u kojima se nalaze predatori i druge kompetitivne vrste (Hartel i sar, 2007; Sinsch i sar., 2020). Predatori jaja i punoglavaca ove vrste su pripadnici taksona kako kičmenjaka tako i beskičmenjaka. Kada je interspecijska kompeticija u pitanju, najčešće kompetitivne vrste su *Hyla arborea*, *Bufo calamita* i *Pelophylax kl. esculentus* (*Rana esculenta*) (Reyer i Barandun, 1997). Osunčane i tople vode često sadrže veliki broj jaja, dok se vode koje su hladne i u senci (zaklonjene od sunca) ne koriste za reprodukciju (Barandun i Reyer, 1998). Jedinke *B. variegata* dostižu polnu zrelost nakon 2-3 godine starosti. Ženke polažu jaja u grupi od 40-70 jaja po paketiću nekoliko puta u toku jedne reproduktivne sezone, koje „lepe“ za stabla vodenih biljaka, komade drveća ili druge objekte koji se nađu u vodi (Rafinska, 1991; Barandun i Reyer, 1997b; Hartel i sar., 2007; Inns, 2011; Speybroeck i sar., 2016). **Slika 3.** prikazuje izabrane stadijume razvića jaja žutotrbog mukača.



Slika 3. Prikaz odabranih stadijuma u razviću žutotrbož mokača viđenih golim okom ili pod binokularnom lupom: a) paketić jaja uzet iz prirode, prikaz kako se jaja vide golim okom; b) Gosnerov stadijum (GS) 5 – jedan od početnih stadijuma embrionalnog razvića kada je embrion podeljen na 8 ćelija; c) GS 7 – embrion je podeljen na 32 ćelije; d) GS 22 – embrion neposredno pred izvaljivanje; e) GS 23 – tek izvaljena jedinka iz jajeta; f) skup tek izvaljenih jedinki, prikaz kako se vide golim okom (foto: A. Radmilović).

Reproduktivni period ove vrste traje od početka maja meseca (nakon prvih obilnih kiša) pa do početka avgusta (Barandun, 1990). Jaja se izvaljuju 4-10 dana nakon polaganja, pri čemu je utvrđeno da se brzina razvića povećava sa povećanjem temperature vode (Barandun, 1990; Dittrich i sar., 2016). Kada su Barandun i Reyer (1997b) pratili razviće žutotrbož mokača u prirodnim populacijama u Švajcarskoj dve uzastopne godine, uočili su razlike u dužini larvalnog perioda žutotrbož mokača između godina. Larvalni period je duže trajao u mesecima koji su hladniji (maj i jun) u odnosu na jul mesec kada je temperatura vode bila veća i razviće kraće za nekoliko dana. Srednje vreme do metamorfoze (uključujući embrionsko razviće) prve godine bilo je u rasponu od 33-58 dana a druge od 34-51 dan. Najveći broj jedinki je metamorfozirao između 38-45 dana u obe godine. Mortalitet jaja od polaganja do metamorfoze je bio 93 % prve, i 87 % druge godine, pri čemu je utvrđeno da je isušivanje staništa dovelo do ovako visoke stope smrtnosti (Barandun i Reyer, 1997b).

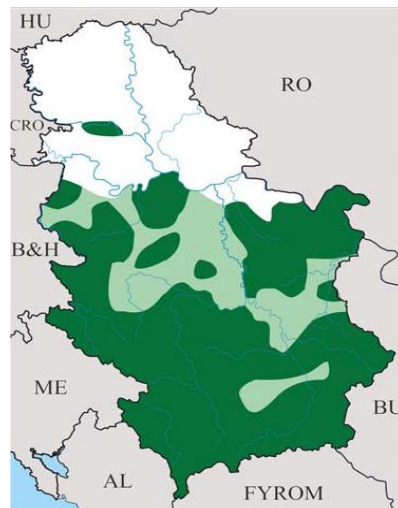
3.1.3 Rasprostranjenje žutotrbož mokača

Žutotrbi mokač naseljava Centralnu i Južnu Evropu, osim jugozapadnih delova (**Slika 4**). Zapadne granice areala ove vrste protežu se preko Nemačke do Holandije, Belgije i Francuske na jugu. Granice areala na severu obuhvataju delove od Nemačke do Češke, južne delove Poljske, Zapadnu Ukrajinu (Karpate), Rumuniju i istočni deo Bugarske (AmphibiaWeb.2024. <<https://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Accessed 7 July 2024).



Slika 4. Rasprostranjenje *B. variegata*. (AmphibiaWeb.2024. <<https://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Accessed 7 July 2024).

Rasprostranjenje žutotrbož mokača u Srbiji je ograničeno na brdske i planinske krajeve naše zemlje a postoje i izolovane populacije u severnom delu - Vojvodini (Simonović i sar., 2004) (**Slika 5.**). Izolovanost populacija na Fruškoj gori je posledica Vurmske glacijacije tj. poslednjeg ledenog doba (koje je počelo pre oko 115 - 130 000 godina a završilo se pre oko 11 000 godina). Istraživači smatraju da su se dve vrste roda *Bombina* odvojile u različite refugijume nakon poslednjeg ledenog doba kako bi proširile svoje areale i u fizičko-geografskom smislu su se rasporedile tako da ne dolazi do kompeticije između njih (Arntzen, 1978). Jedan od značajnih refugijuma žutotrbož mokača na Balkanu je planina Fruška gora koja je u prošlosti bila ostrvo u Panonskom moru (9 miliona godina) i čija je izolovanost doprinela očuvanju populacija žutotrbož mokača. Redukovan protok gena usled izolacije, male populacije, genetički drift i prirodna selekcija dovode do redukovanja genetičke varijabilnosti i povećane diferencijacije ovih populacija.



Slika 5. Distribucija žutotrbož mokača u Srbiji (svetlo-zelena boja: zaključena distribucija vrste, tamno-zelena boja: potvrđena distribucija vrste). Preuzeto iz Vukov i sar., 2013.

3.2 Eksperimentalni dizajn

U cilju procene uticaja isušivanja staništa na osobine životne istorije, kao i morfološke i fiziološke osobine žutotrbog mukača, sprovedena su tri eksperimenta u tri uzastopne godine/sezone. Područja uzorkovanja jaja, za sva tri eksperimenta, nalaze se na prostoru Nacionalnog parka "Fruška Gora" u Vojvodini, u severnom delu Srbije (539 m nadmorske visine, geografska širina 45.15708° i geografska dužina 19.709327°) (Milosavljević i sar., 1973). Za svaku godinu eksperimenta jaja su sakupljena u istom periodu godine, na početku sezone parenja kada su uslovi bili povoljni (krajem maja meseca). Teritorija Fruške gore se odlikuje prisustvom velikog broja privremenih stajaćih voda poput malih bara, kanala pored puta, ulegnuća u zemlji na šumskim putevima koja nastaju prolaskom teških vozila u kojima se zadržava voda nakon kiše. Vreme trajanja ovih vodenih površina je različito, ali je terenskim istraživanjima utvrđeno da većina presuši do početka jula meseca. Ženka žutotrbog mukača polaže jaja u paketićima i lepi ih za podvodne delove vodenih biljaka. U proseku se položi 40-70 jaja po jednom paketiću (Barandun i Reyer, 1997a).

Jaja su uzeta iz različitih privremenih voda, koje su bile međusobno udaljene minimum 100 m, kako bi se izbeglo sakupljanje jaja položenih od strane iste ženke, nakon čega su preneti u laboratoriju Odeljenja za Evolucionu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Pretpostavka je da je svaki paketić jaja bio oplodjen od strane drugog mužjaka. Jaja su držana zajedno u velikim kutijama koje su bile napunjene odstajalom vodom. Konstantni uslovi u laboratoriji su održavani tokom sva tri eksperimenta, sa prirodnim fotoperiodom i temperaturom vazduha od 20°C. Jaja su svakog drugog dana posmatrana golim okom ili pod lupom da bi im se odredio stadijum razvika pogodan za početak eksperimenta.

3.2.1 Opis odabranih ontogenetskih stadijuma i gajenje jedinki

Premetamorfoza (GS 26-30), prometamorfoza (GS 31-41) i metamorfozni klimaks (GS 42-46) su tri osnovne faze procesa metamorfoze koje karakterišu specifične anatomske, morfološke, fiziološke i promene u ponašanju jedinki. S obzirom na to da u premetamorfozi jedinke intenzivno rastu bez bilo kakvih metamorfnih promena, ispitali smo kako isušujući uslovi utiču na: kasni stadijum premetamorfoze i početak prometamorfoze (GS 30-32), srednje stadijume prometamorfoze (GS 32-34 i GS 35-37), početak metamorfoznog klimaksa (GS 42) i kraj metamorfoznog klimaksa tj. metamorfoze (GS 46).

U ovoj disertaciji je u tri nezavisna eksperimenta testirano kako isušujući uslovi utiču na sledeće ontogenetske (Gosnerove (Gosner, 1960)) stadijume:

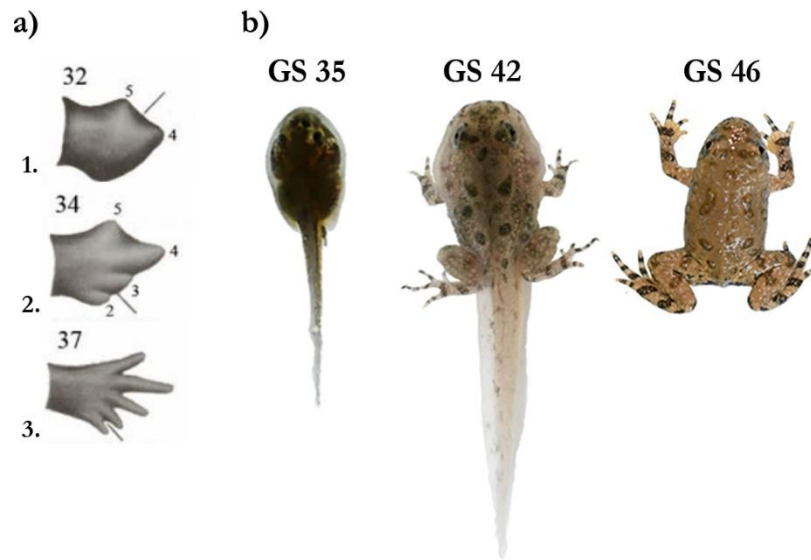
1. GS 30-32 – telo punoglavaca je zdepasto, rep proporcionalno dugačak, sa izraženim repnim perajem. Oči su smeštene lateralno, ali počinju blago da se pomeraju dorzalno. Usni aparat razvijen, sa jednim gornjim i više donjih redova keratinoznih zubića. Bočna linija je funkcionalna. Blagi porast koncentracije TH u fiziološkim uslovima (i CORT-a u stresnim uslovima). Vidljivi su začeci zadnjih ekstremiteta (**Slika 6. a**)).
2. GS 32-34 - oči su dorzolateralno postavljene čime se omogućava šire vidno polje. Usni aparat potpuno formiran za efikasno struganje podloge. Koncentracija TH (i CORT-a) nastavlja da raste. Začeci zadnjih ekstremiteta su jasno vidljivi, kratki i imaju oblik vesla (**Slika 6. a**)).
3. GS 35-37 – oči su dorzalno postavljene i čulo vida je potpuno funkcionalno za kopneni život. Zadnji ekstremiteti su dugački, potpuno funkcionalni i jasno segmentisani. Jasno se

uočava razmak između prstiju (**Slika 6. a**) i b)). Neuroendokrini sistem je dovoljno razvijen i očekuje se da je koncentracija TH i CORT-a dovoljno visoka da omogući ubrzanje razvića pod stresnim uslovima.

4. GS 42 – početak metamorfoze koji se karakteriše naglim promenama na svim nivoima koje omogućavaju prelazak jedinke iz vodenog u kopneno stanište (**Slika 6. b**)). Dolazi do pojave prednjih ekstremiteta (koji su bili skriveni ispod operkularne membrane) i započinje intenzivna resorpcija repa putem apoptoze. Škrge se u potpunosti zamenjuju plućima. Koncentracija TH i CORT-a dostiže svoj maksimum. Zbog intenzivne metaboličke aktivnosti dolazi do produkcije ROS-a. Jedinke se ne hrane sve do završetka metamorfoze (GS 46), odnosno potpune resorpcije repa i uspostavljanja funkcionalnosti svih organskih sistema za život u terestričnim uslovima.
5. GS 46 – označava završetak metamorfoze, odnosno prelaz iz larvalne u juvenilnu, kopnenu formu (**Slika 6. b**)). Glavna karakteristika ovog stadijuma je potpuna resorpcija repa. Na trbuhu juvenilnih jedinki žutotrbog mukača se uočava aposematska obojenost, koja vremenom postaje sve intenzivnija. U GS 46 pluća su potpuno funkcionalna i jedinka prelazi na kopneno disanje. Koža i dalje ima respiratornu funkciju, ali u manjoj meri. Nivo TH i CORT-a opada, što označava kraj metamorfoze.

Jedinke su u svim eksperimentima hranjene *ad libitum* svakog drugog dana hranom za ribe (Tetra TabiMin, Tetra GmbH, Melle, Germany). Od početka eksperimenta (GS 25) do GS 32 jedinke su hranjene ¼ tablete za ribe, od GS 33-36 su hranjenje ½ tablete a od GS 36-42 celom tabletom po eksperimentalnoj kutiji. Dimenzije svake kutije u eksperimentima br. 1 i 2 su bile 42 x 32 x 21.5 cm gde su jedinke gajene u kohortama. U svim eksperimentima je voda menjana svakog četvrtog dana kako bi se izbegla akumulacija štetnih podukata i hormona. Kada je menjana voda menjan je i raspored kutija u laboratoriji, da bi se izbegao bilo kakav efekat mesta kutije usled potencijalnih mikroklimatskih (temperaturnih i svetlosnih) razlika u laboratoriji. Razviće jedinki kao i njihovo preživljavanje je praćeno svakog dana.

Pošto su jedinke u eksperimentu br. 3 od GS 35 odgajane pojedinačno (kada je i počeo ovaj eksperiment), od GS 35-38 svaka jedinka je hranjena ¼ tablete za ribe, a od GS 39-42 ½ tablete za ribe. Svaka kutija je predstavljala jednu eksperimentalnu jedinicu. Dimenzije svake kutije u eksperimentu br. 3 su bile 10.5 x 10.5 x 12.5 cm. Sa zamenom vode koja je obavljena svakog četvrtog dana, svaki put je menjan i egzogeni CORT kao i njegov inhibitor MET kako bi njihove koncentracije u vodi bile adekvatne i kako bi se izbegla akumulacija štetnih podukata i hormona.



Slika 6. Izgled odabranih stadijuma u eksperimentima. a) Razviće zadnjih ekstremiteta po Gosnerovim stadijumima (Preuzeto iz Gosner, 1960): 1. GS 32; 2. GS 34; 3. GS 37. b) Izgled jedinki u GS 35, GS 42 i GS 46 (foto: A. Radmilović).

3.3 Prikupljanje podataka

3.3.1 Prikupljanje podataka za analize osobina životne istorije

Nakon dostizanja GS 42, svaka jedinka je premeštena u novu kutiju gde su joj obezbeđeni suvozemni uslovi sve do GS 46. Po dostizanju GS 42 i GS 46, jedinke su fotografisane sa dorzalne strane digitalnim fotoaparatom (Nikon D7500, AF-S DX Micro-Nikkor 40mm f/2.8G, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) na standardnoj udaljenosti zajedno sa milimetarskim papirom koji predstavlja skalu, kako bi se dobile informacije o ukupnoj dužini tela jedinki (u mm). U GS 42 ukupnu dužinu tela jedinki čini zbir dužine trupa (merenog od vrha njuške do kloake, engl. *Snout-to-vent-length*, SVL) i repa (merenog od kloake do vrha repnog peraja). U GS 46 dužina tela jedinki predstavlja dužinu trupa (odnosno SVL). Za svaku jedinku je na oba stadijuma (GS 42 i GS 46) zabeležena dužina larvalnog perioda (u danima), dužina tela jedinki (u mm), masa (u g), izračunata stopa rasta, kondicioni indeks i stopa preživljavanja jedinki po tretmanu.

Individualni rast jedinki je praćen beleženjem datuma ulaska u GS 25, kao i dostizanje GS 42 i GS 46. Dužina razvića (merena u danima) koja protekne od GS 25 do GS 42 i GS 46 predstavlja larvalni period/interval razvića jedinke. U eksperimentu br. 3 larvalni period je izračunat kao vremenski period (u danima) koji protekne od početka ovog eksperimenta (GS 35) do GS 42. Individualna stopa rasta je izračunata kao količnik mase jedinke (na GS 42/GS 46) i njenog larvalnog perioda.

Masa jedinki (u gramima, g) na oba stadijuma je merena na istoj vagi sa preciznošću od 0.0001 g.

U eksperimentu br. 1 su izračunate i ontogenetske trajektorije jedinki. Ontogenetske trajektorije analiziranih tretmana koje najbolje opisuju rast jedinki preko obrazaca variranja dužine

tela i mase, izračunate su na osnovu podataka koji predstavljaju srednje vrednosti jedinki po kutiji na svakih pet dana. Na ovaj način smo pratili grupni rast jedinki sve dok prve jedinke nisu dostigle GS 42.

Kondicioni indeks (engl. *Body condition index* – BCI) je predložen kao veoma koristan pokazatelj stanja populacije što je posebno značajno za konzervacionu biologiju. BCI je pokazatelj ekološkog stresa, kvaliteta staništa (Sztatecsny i Schabetsberger, 2005), reproduktivnog ulaganja (Castellano i sar., 2004) i preživljavanja (Hoey i McCormick, 2004). Zbog toga je ovaj parameter i izabran kao jedan od pokazatelja stanja populacije žutotrbog mukača u uslovima isušivanja staništa. BCI je takođe pokazatelj energetskih rezervi jedinki, i jedinke koje imaju veći BCI imaju i više rezervnih materija (uglavnom masti) od jedinki koje imaju niži BCI (Dobson, 1992). Iako postoji više vrsta BCI (Fultonov indeks (Sztatecsny i Schabetsberger, 2005), relativni maseni kondicioni indeks (Hansen, 2005), rezidualni indeks (Denoël i sar., 2002), skalirani maseni indeks (Peig i Green, 2009)), za eksperiment br. 1 je izabran rezidualni indeks koji koristi rezidualne ln mase u odnosu na ln dužinu tela jedinki u GS 42/GS 46 dobijenih iz linearne regresije (Székely i sar., 2020). Takođe, Bāncilā i sar. (2010) su zaključili da je rezidualni indeks najbolji za interpretaciju efekata različitih stresnih faktora životne sredine koji deluju na žutotrbog mukača, a takođe je pogodan zbog jednostavne biološke interpretacije.

U eksperimentima br. 2 i 3 kondicioni indeks je određen koristeći skalirani maseni indeks (engl. *Scaled mass index* - SMI) prema Peig i Green (2009). SMI uzima u obzir alometrijski odnos između mase i dužine tela i predstavlja standardizovanu meru kondicionog indeksa koja se može direktno upoređivati među jedinkama (Peig i Green, 2009). SMI se često koristi kao kondicioni indeks kod punoglavaca (Dittrich i sar., 2016; Ruthsatz i sar., 2018, 2023). Visok SMI ukazuje na veće zalihe energije i, stoga, na dobar kondicioni indeks. SMI nagib se izračunava iz regresije logaritamski transformisanog SVL-a i logaritamski transformisane mase.

$$\text{Skalirani Maseni Indeks (SMI)} = M_i [L_0/L_i]^{bSMA}$$

M_i – masa jedinke na GS 42/GS 46; L_i – SVL jedinke na GS 42/GS 46, odnosno dužina trupa jedinke; L_0 – srednja vrednost SVL-a svih punoglavaca po stadijumu; $bSMA$ – vrednost odnosa SVL-a i mase (specifična za svaku vrstu) koja je dobijena modelom standardizovanih glavnih osa transformisanih (ln transformacija) vrednosti masa na SVL punoglavaca. Da bi se obuhvatio reprezentativni opseg merenja SVL-a i mase za $bSMA$ (Peig i Green, 2009), korišćene su ne samo vrednosti SVL-a i mase jedinki iz naših eksperimenata već i podaci o SVL-u i masi adultnih jedinki ($N=55$) sa istog lokaliteta, prikupljenih tokom terenskih istraživanja, kako bi bila dobijena što preciznija krivulja.

Uslovi isušivanja staništa utiču različito na preživljavanje kod različitih vrsta žaba i razlikuju se rezultati dobijeni praćenjem preživljavanja u prirodnim populacijama od onih u eksperimentalnim uslovima. Barandun i Reyer (1998) su u prirodnim populacijama uočili veliki mortalitet jaja žutotrbog mukača u prirodnim populacijama, pa je iz ovog razloga ispitivanje ove osobine životne istorije od velikog značaja za naše eksperimente. Stopa preživljavanja za svaki tretman u svim eksperimentima je izračunata kao procenat jedinki koje su preživele od početka (GS 25/GS 35) do kraja eksperimenta (GS 42/GS 46).

3.3.2 Prikupljanje podataka za analize morfoloških osobina i odabir specifičnih tačaka

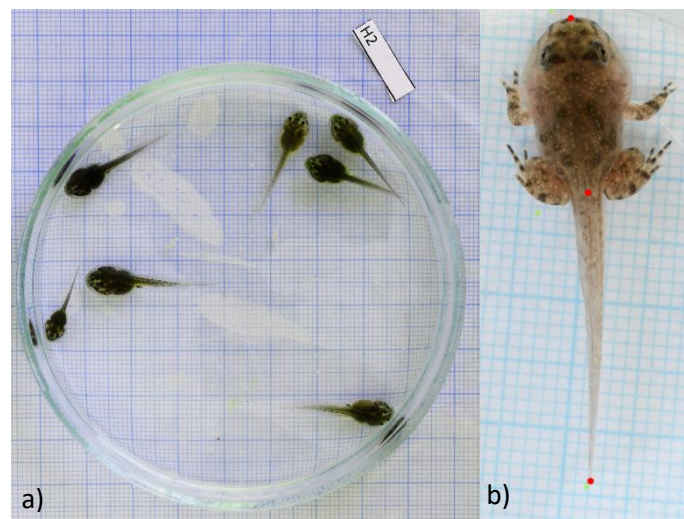
Kada su morfološke osobine jedinki u pitanju, u GS 42 pratile su se promene u dužini (svi eksperimenti) i obliku repa (eksperimenti br. 1 i 3) i dužina trupa, a u GS 46 dužine pojedinačnih

elemenata prednjih i zadnjih ekstremiteta kao i dužina i širina glave (eksperiment br. 1). Takođe su ispitane lokomotorne performanse, odnosno dužina skoka metamorfoziranih jedinki (eksperiment br. 1). Da bi se ispitalo da li i na koji način različiti vodeni uslovi utiču na varijabilnost morfoloških struktura na ova dva stadijuma, korišćene su metode tradicionalne i geometrijske morfometrije.

Morfometrija podrazumeva precizan kvantitativni opis, analizu i tumačenje veličine i oblika organizma ili neke od njegovih morfoloških struktura. Morfometrija takođe omogućava dobijanje informacija o obrascima morfološke varijabilnosti, ali i principima promena morfoloških celina, odnosno koji sve mogući procesi i mehanizmi mogu da dovodu do promene morfoloških celina (Ivanović i Kalezić, 2013). U morfometriji postoje dva pristupa - tradicionalna i geometrijska morfometrija - i oba se mogu primeniti u studijama morfološke varijabilnosti na različitim stadijumima razvića bezrepih vodozemaca (punoglavaca i juvenilnih/adultnih žaba).

Tradicionalna (linearna) morfometrija, uz pomoć multivarijantnih statističkih metoda, omogućava proučavanje varijabilnosti oblika i veličine morfoloških struktura, pri čemu se strukture opisuju dužinskim merama. Podaci u ovoj studiji su prikupljeni merenjem spoljašnjih morfoloških karakteristika, dužinskih dimenzija (morfometrijskih varijabli), na fotografijama jedinki visoke rezolucije. Na fotografijama je merena udaljenost između jasno definisanih anatomskih tačaka (engl. *landmarks*) koje se mogu precizno i ponovljivo odrediti kod svih jedinki u analiziranom uzorku.

Maksimalne dužine trupa i repa, širina i dužina glave, kao i dužine elemenata ekstremiteta u milimetrima, određene su kao rastojanja između parova specifičnih tačaka koje predstavljaju krajnje tačke normalne na uzdužnu osu svake ispitivane pojedinačne morfološke osobine. Ove tačke su postavljene u programu za digitalizaciju specifičnih tačaka TpsDig2 (Slika 7.) (Rohlf, 2006). Dimenzije između odabranih parova tačaka, izračunate kao Euklidsko rastojanje, dobijene su u Tmorphgen6 programu iz Integrisanog Morfometrijskog Programa (IMP) paketa (Sheets, 2000).



Slika 7. Prikaz jedinki slikanih grupno po kutiji u eksperimentu br. 1 (a) i individualno u GS 42 u svim eksperimentima (b). Crvene tačke na slici (b) prikazuju način tačkanja trupa i repa jedinke u GS 42, čiji zbir predstavlja ukupnu dužinu tela jedinke (foto: A. Radmilović).

Osim što su u GS 42 u svim eksperimentima jedinke fotografisane dorzalno kako bi se izmerila dužina trupa i repa (što čini ukupnu dužinu tela), u eksperimentima br. 1 i 3 su fotografisane i lateralno kako bi se dobila informacija o promenama u obliku repa. Oblik repa je izabran za poređenje pošto predstavlja osnovni organ za kretanje punoglavaca, i očekuje se da promene u vodenim uslovima mogu da dovedu do promena u obliku repa, jer promene vodenih uslova dovode i do promena u ponašnju jedinki, ishrani, inter- i intraspecijskoj kompeticiji, što sve utiče na fitnes punoglavaca.

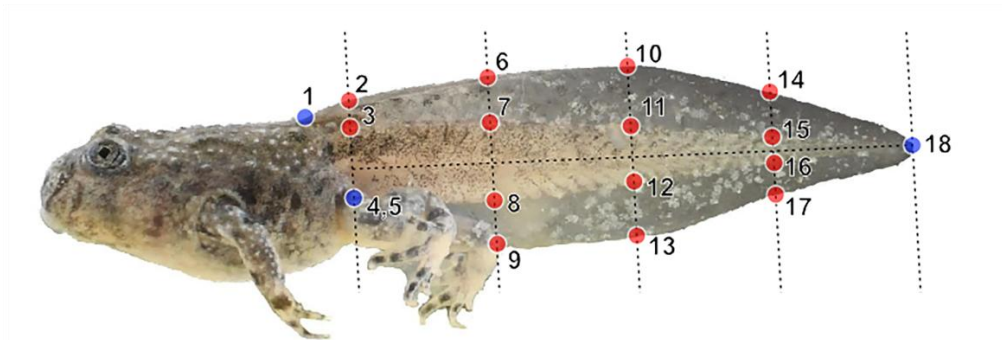
Geometrijska morfometrija je korišćena za analizu oblika repa punoglavaca gajenih u različitim vodenim uslovima. U svrhu dobijanja fotografija za analizu oblika repa, svaki punoglavac je smešten u malu staklenu posudu (napravljenju od tankih pokrovnih stakala) ispunjenu vodom sa milimetarskim papirom kao mernom skalom sa fotoaparatom postavljenim ispred posude na fiksnoj rastojanju (**Slika 8.**).



Slika 8. Lateralno fotografisanje punoglavca za dobijanje informacija o promenama u obliku repa izazvanih isušivanjem staništa (foto: A. Radmilović).

Skup od 3 tačke i 15 polutačaka (engl. *semi-landmarks*) dobijen je postavljanjem referentnih tačaka na fotografije u programu tpsDig (Rohlf, 2006), kako bi se dobile informacije o promenama u obliku repa (**Slika 9.**). Specifična tačka 1 je pozicionirana na mestu gde prestaje trup punoglavca i započinje slobodni deo repnog peraja. Specifična tačka 5 je pozicionirana na mestu između trupa i donje ivice mišića repa u nivou zadnjih ekstremiteta, dok je specifična tačka 18 postavljena na vrhu repa. Sve ostale polutačke su postavljene na spoljašnjim ivicama repa sa jednakom međusobnom udaljenošću. Ujednačen raspored tačaka je postignut korišćenjem programa MakeFan6 iz serije integriranih programa za morfometriju (engl. *Integrated Morphometrics Program–IMP*) (Sheets 2000), koji se često koristi za opisivanje oblika različitih morfoloških struktura (Cvijanović, 2010; Mirč, 2021).

Položaji tačaka i polutačaka su: 1. tačka: mesto spajanja trupa i dorzalne ivice repnog peraja; 5. tačka: mesto spajanja trupa i donje ivice mišića repa u nivou zadnjih ekstremiteta; 18. tačka: vrh repnog peraja; 2., 3., 4. polutačka: dorzalna strana repnog peraja, dorzalna strana repnog mišića i ventralna strana repnog mišića u ravni sa tačkom 5; 6., 7., 8., 9. polutačka: dorzalna strana repnog peraja, dorzalna strana repnog mišića, ventralna strana repnog mišića i ventralna strana repnog peraja na $\frac{1}{4}$ rastojanja između tačke 5 i tačke 18; 10., 11., 12., 13. polutačke: dorzalna strana repnog peraja, dorzalna strana repnog mišića, ventralna strana repnog mišića i ventralna strana repnog peraja na $\frac{1}{2}$ rastojanja između tačke 5 i tačke 18; 14., 15., 16., 17. polutačka: dorzalna strana repnog peraja, dorzalna strana repnog mišića, ventralna strana repnog mišića i ventralna strana repnog peraja na $\frac{3}{4}$ rastojanja između tačke 5 i tačke 18; (Pujol-Buxó i sar., 2020; Kijanović i sar., 2023).



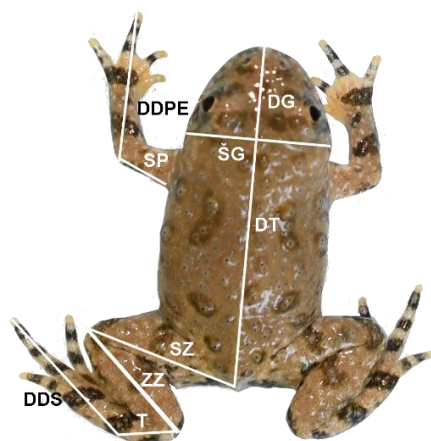
Slika 9. Prikaz rasporeda tačaka (označenih plavom bojom) i polutačaka (crvena boja) za analizu oblika repa punoglavaca. Detaljan opis tačaka je dat u tekstu.

Generalizovana Prokrustova analiza (GPA), analiza oblika i vizualizacija varijabilnosti u obliku repa između grupa urađene su u programu MorphoJ (Klingenberg, 2011).

Po dostizanju GS 46 izmerene su dužine elemenata prednjih i zadnjih ekstremiteta kako bi se utvrdio prenosni efekat isušivanja staništa na morfološke strukture metamorfoziranih jedinki. Prethodna istraživanja su pokazala da isušivanje staništa u larvalnoj fazi ima različite prenosne efekte na morfologiju i funkcionalnost ekstremiteta žaba što direktno utiče na njihovo prilagođavanje i preživljavanje na kopnu.

Da bi se ispitali prenosni efekti isušivanja staništa na dužine prednjih ekstremiteta žutotrbož mokača izmereni su (**Slika 10.**): stilopodijalni deo (SP) (meren od aksilarne jame do spoljašnjeg vrha lakatnog zgloba jedinke) i distalni deo prednjih ekstremiteta (DDPE) (meren od spoljašnjeg vrha lakatnog zgloba do vrha trećeg prsta jedinke). Od elemenata zadnjih ekstremiteta izmereni su: stilopodijalni deo zadnjeg ekstremiteta (SZ) (meren od otvora kloake do vrha zgloba kolena), zeugopodijalni deo zadnjeg ekstremiteta (ZZ) (meren od vrha zgloba kolena do završetka tibio-fibule), skočni deo (I) (meren od dela koji odgovara početku petne kosti (calcaneum) do dela gde počinju metatarzalne kosti) i distalni deo stopala (DDS) (meren od početka metatarzalnih kostiju do vrha najdužeg prsta).

Sve jedinke su fotografisane na istoj razdaljini dorzalno sa skalom, istim fotoaparatom. Tačke su postavljane u programu tpsDig kako bi se dobile dužine odabranih elemenata prednjih i zadnjih ekstremiteta primenom metoda tradicionalne morfometrije. Takođe je merena dužina i širina glave. Širina glave merena je postavljanjem dve simetrične tačke na najšire delove lobanje. Merenje je vršeno horizontalno, kako bi se zabeležila maksimalna širina glave svake jedinke. Dužina glave je merena od vrha njuške do tačke preseka širine glave.



Slika 10. Prikaz merenja dužine tela, dužine i širine glave i pojedinačnih elemenata prednjih i zadnjih ekstremiteta: DT – dužina tela; DG – dužina glave; ŠG – širina glave; elementi prednjih ekstremiteta: SP – stilopodijalni deo; DDPE – distalni deo prednjih ekstremiteta; elementi zadnjih ekstremiteta: SZ – stilopodijalni deo zadnjeg ekstremiteta; ZZ – zeugopodijalni deo zadnjeg ekstremiteta; T – skočni deo; DDS – distalni deo stopala. Detaljan opis merenja struktura je dat u tekstu.

Nakon 24 sata od dostizanja GS 46 u eksperimentu br. 1, ispitane su lokomotorne sposobnosti, tj. skakačke performanse metamorfoziranih jedinki. Testiranje je obavljeno u istoj prostoriji, pod istim laboratorijskim uslovima u kojima se odvijao i razvoj jedinki. Za potrebe merenja skakanja napravljena je arena dužine 1 m i širine 25 cm. Zidovi arene su bili od stiropora a putanja po kojoj su se kretale jedinke je obložena belim papirom kako bi se jasno videli otisci koje ostavlja jedinka koja se testira. Skakačke sposobnosti su testirane na uzorku od 90 jedinki (30 jedinki po tretmanu) merenjem maksimalnog skoka jedinki. Maksimalni skok je najveća vrednost skoka u seriji od 10 skokova koje jedinka napravi po ulasku u arenu. Neposredno pred početak testiranja skakanja svaka jedinka je stavljena u malu Petrijevu posudu sa prehrambenom jestivom bojom (boja je rastvorena u odstojaloj vodi) nakon čega je nežnim dodiranjem četkice za bojenje po urostilu podstaknuta da skače (Orizaola i Laurila, 2009) (**Slika 11.**). Prilikom skakanja, jedinke vrhom zadnjeg dela tela ostavljaju vidljivi otisak na papiru. Razmak između dva otiska je dužina jednog skoka. Za analize je korišćena najveća vrednost od 10 uzastopnih skokova i ona predstavlja maksimalnu dužinu skoka date jedinke (Enriquez-Urzelai i sar., 2013).



Slika 11. Merenje skakačkih sposobnosti metamorfoziranih jedinki. a) izgled arene u kojoj su jedinke skakale; b) podsticanje jedinke na skok; c) tragovi na papiru koje ostavlja analizirana jedinka (foto: A. Urošević).

3.3.3 Prikupljanje podataka za analize fizioloških osobina

Kada su u pitanju fiziološke promene jedinki nastale usled isušivanja staništa u eksperimentu br. 3, ispitano je kako isušivanje staništa utiče na nivo kortikosterona u GS 35 i GS 42 i kako promene u nivou ovog hormona utiču na sve osobine životne istorije i morfološke osobine jedinki u GS 42. Pošto su prethodna istraživanja pokazala da isušivanje staništa i promene u nivou CORT-a negativno utiču i na antioksidacioni zaštitni sistem, ispitane su i promene u ovom sistemu merenjem parametara oksidacionog stresa u GS 35 i GS 42.

Polovina od početnih 208 jedinki u eksperimentu br. 3 (**Tabela 5.**) je žrtvovana u tečnom azotu 24 sata nakon početka eksperimenta (GS 35) da bi se izmerio nivo CORT-a i parametara oksidacionog stresa. Sve do trenutka merenja CORT-a, jedinke su bile zamrznute na -80°C . Zbog male veličine tela i mase jedinki u ovom stadijumu, grupisane su tri ili četiri larve po tretmanu u zavisnosti od njihovih masa kako bi se dobio jedan uzorak. Taj homogenizovani uzorak je podeljen na dva dela. Jedan deo uzorka je iskorišćen za merenje celokupnog sadržaja CORT-a u telu, dok je drugi deo iskorišćen za merenje koncentracija antioksidacionih enzima. Izmeren je različit broj uzoraka po tretmanu: H = 7, L = 6, H+CORT = 7 i L+MET = 5 uzoraka.

U GS 42 jedinke su žrtvovane u tečnom azotu da bi se izmerio nivo CORT-a i parametri oksidacionog stresa. Iz istog razloga kao i na GS 35, i na GS 42 grupisane su dve ili tri larve po tretmanu u zavisnosti od njihovih masa kako bi se dobio jedan uzorak, i iz polovine homogenizovanog uzorka se izmerio celokupni sadržaj CORT-a a iz druge parametri oksidacionog stresa. Izmeren je različit broj uzoraka po tretmanu: H = 5, L = 7, H+CORT = 6 i L+MET = 7 uzoraka.

Celokupni CORT iz tela jedinki je izolovan po proceduri Beneta i saradnika (2016). Punoglavci koji su čuvani na -80°C su nakon odležavanja izmereni a zatim fino usitnjeni-homogenizovani (Ultra Turrax homogenizator (T-18, IKA-Werk, Nemačka)) sa dejonizovanom H_2O (u razmeri 1:1.66) tokom 2 x 15 sekundi. Homogenati su sonifikovani (Sonopuls HD 2070, Bandelin electronic, Nemačka) tokom 2 x 15 sekundi i ostavljeni preko noći na -80°C . Zatim je sledećeg dana dodat metanol u sonikate u razmeri 1:1 sa masom tkiva/sonikata nakon čega je uzorak vorteksovan 1 min. Šest mililitara dihlormetana je dodato u svaki uzorak, ostavljeno na mešalici 15 minuta, a zatim smrznuto na -80°C tokom 1 sata. Uzorci su nakon toga centrifugirani tokom 15 minuta na 4500 rpm (2000g) na 4°C . Dobijeni supernatanti su preneti u epruvete i stavljeni u vodeno kupatilo, na 35°C (oko 12h). Epruvete sa suvim ostatkom su zatim zatvorene i smrznute na -80°C dok se nije uradila radioimunološka analiza (*Radioimmunoassay* - RIA). Nivoi CORT-a su mereni sa Corticosterone Double Antibody RIA Kitom (MP Biomedicals, Orangeburg, NY, USA). Merenje nivoa CORT-a je urađeno na Institutu za primenu nuklearne energije (INEP) prema uputstvima proizvođača. Dobijene vrednosti CORT-a su upoređene sa standardnom krivom poznatih koncentracija kortikosterona. Izračunavanje celokupnog CORT-a iz procenata vezivanja standardnih kriva i broja impulsa po minuti je izvršeno u gama brojaču (Perkin Elmer 1470 Wizard Gamma Counter) i ta vrednost je podeljena sa početnom masom uzorka kako bi se dobio CORT u pg/g telesne mase.

Kada je u pitanju merenje oksidacionog stresa, deo svakog uzorka (oko 0.2 g) korišćen je za određivanje lipidnih peroksida- supstanci reaktivnih na tiobarbiturnu kiselinu (TBARS), a ostatak za određivanje antioksidacionih parametara. Uzorci su homogenizovani u razmeri 1:5 u hladnom rastvoru 25mM saharoze pH 7.4, koja je sadržala 10 mM Tris-HCl i 5 mM EDTA pomoću Ultra Turrax homogenizatora (T-18, IKA-Werk, Nemačka) (Lionetto i sar., 2005; Abele i sar., 2011). Zatim su homogenati sonifikovani na 20 kHz, tokom 30 sekundi koristeći ultrazvučni homogenizator (Sonopuls HD 2070, Bandelin electronic, Nemačka). Jedan deo svakog sonikata je centrifugiran na $5000 \times g$ tokom 10 minuta u 10% sulfosalicilnoj kiselini i dobijeni supernatanti su

kasnije korišćeni za merenje ukupne koncentracije GSH. Procena GSH-a zasniva se na procesu u kojem se GSH oksiduje sa 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB) i redukuje sa NADPH u prisustvu glutatjon reduktaze (GR) kako je opisano od strane Griffitha (1980). Vrednosti GSH-a su izražene u nmol g⁻¹ tkiva. Ostatak sonikata u epruvetama je stavljen i centrifugiran na 100,000 × g na 4 °C tokom 90 minuta u ultracentrifugi (Beckman, SAD). Iz supernatanta je merena aktivnost CAT i GSH-Px. Prema metodi opisanoj od strane Claibornea (1984), CAT aktivnost je procenjena na 240 nm koristeći H₂O₂ kao supstrat. Metoda se zasniva na praćenju brzine dekompozicije H₂O₂ u H₂O i O₂ pod delovanjem CAT. Smanjenje apsorbancije zbog potrošnje H₂O₂ detektovano je spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 240 nm. Prema protokolu Tamure i saradnika (Tamura i sar., 1982), GSH-Px aktivnost je određena na osnovu oksidacije NADPH u NADP⁺ u prisustvu oksidovanog glutationa (GSSG) i GR na talasnoj dužini od 340 nm. Obe enzimske aktivnosti su izražene kao jedinice po miligramu proteina. Ukupne koncentracije proteina su određene na talasnoj dužini od 500 nm metodom Lowry (1951), koristeći goveđi serumski albumin (BSA) kao standard. Koncentracije supstanci reaktivnih na tiobarbiturnu kiselinu (TBARS) kao markeri procesa lipidne peroksidacije (LPO) i potencijalne oksidacione štete su procenjene prema Rehnrcrona i sar. (1980). Za određivanje nivoa LPO-a, uzorci su homogenizovani i sonifikovani u razmeri 1:10 u hladnom Tris-HCl rastvoru (pH 7.4) bez saharoze. Nakon toga, sonikati su centrifugirani u 40% TCA na 10,000 × g na 4°C. Sadržaj TBARS formiranih spontano je meren nakon tretiranja uzoraka sa hladnim rastvorom tiobarbiturne kiseline (10% trihlorsirćetne kiseline, 0.6% tiobarbiturne kiseline) i naknadnog zagrevanja na 100°C. Koncentracija lipidnog peroksida (LPO) je analizirana na talasnoj dužini od 532 nm i izražena kao nmol po gramu tkiva.

Svi ispitani parametri oksidacionog stresa su mereni na 25°C (Abele i sar., 2011) koristeći UV1800 UV-VIS spektrofotometar (Shimadzu, Japan) koji ima temperaturno-kontrolisane držače za kivete.

3.4 Eksperiment I: Utvrđivanje sposobnosti žutotrbog mukača da ubrza razviće u uslovima isušivanja staništa

Prvi eksperiment je imao za cilj da utvrdi promene u brzini razvića u uslovima isušivanja staništa (po Vilbur-Kolinsovom modelu). Drugim rečima, prvim eksperimentom smo ispitali da li će žutotrbi mukač ubrzati svoje razviće u isušujućim uslovima, tj. da li će ispoljiti adaptivnu fenotipsku plastičnost i kako će se to odraziti na druge osobine životne istorije i morfološke osobine u GS 42 i GS 46. Ovaj tip eksperimenta je urađen po uzoru na eksperimente Johansson i sar., (2005), Lind i Johansson (2007), Lind i sar., (2008), Johansson i sar., (2016), Székely i sar., (2017).

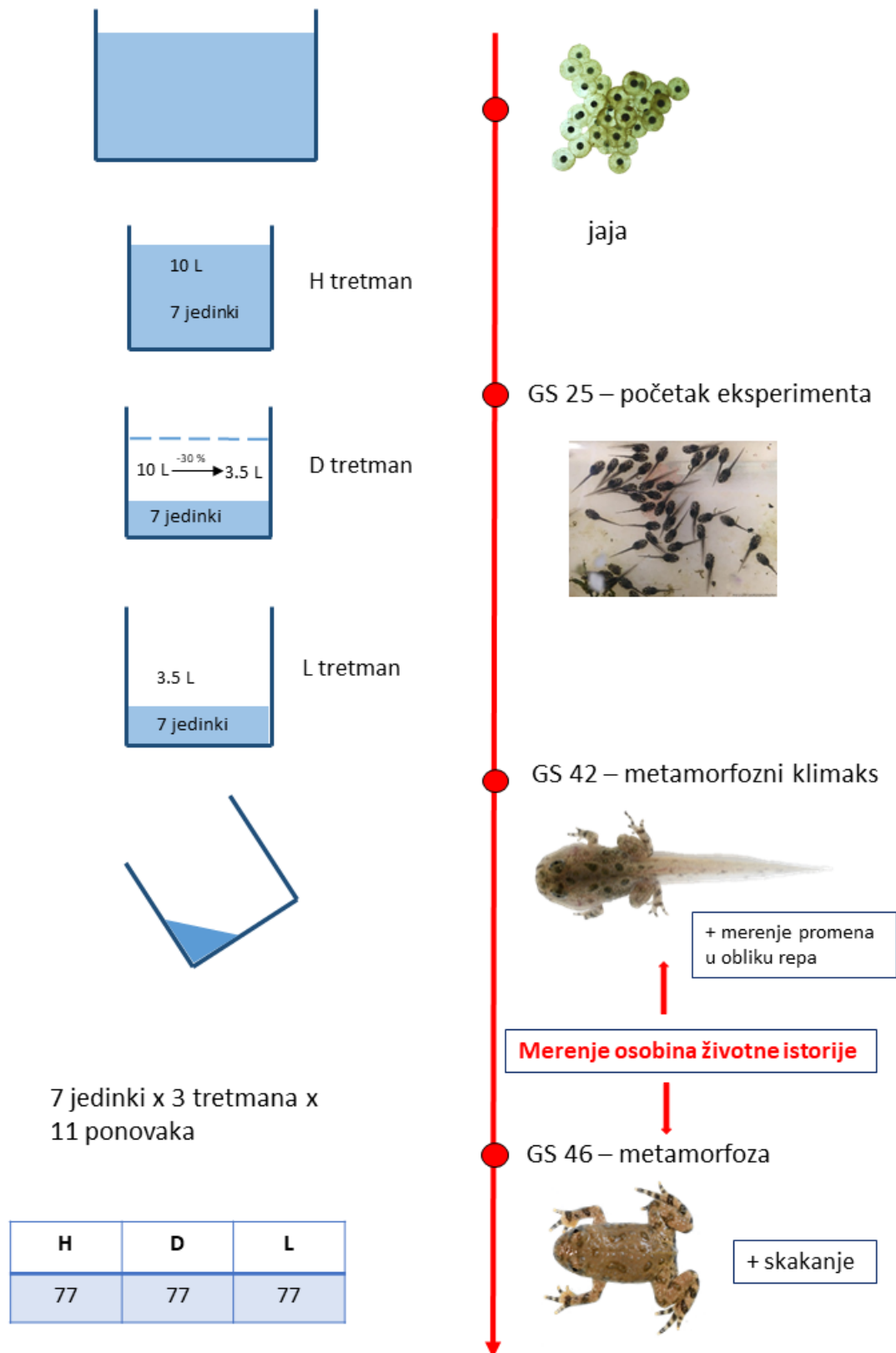
Za ovaj eksperiment je iz prirode uzeto 11 paketića jaja žutotrbog mukača, a kada su jedinke počele da plivaju i da se hrane (odnosno kada su dostigle GS 25 kada je i započeo eksperiment), nasumično je iz zajedničke kutije odabrana 231 jedinka koja je dodeljena jednom od tri tretmana (**Slika 12.**). Jedinke unutar svakog tretmana bile su grupno odgajane, po 7 jedinki u kutiji, sa 11 ponavljanja po tretmanu, što je ukupno činilo 33 eksperimentalne kutije (**Tabela 1.**). Tretmani su bili sledeći:

1. H tretman (engl. *high water level*) – konstantno visoki vodeni uslovi; sa zapreminom vode od 10 L, i visinom vodenog stuba 9.4 cm.

2. D tretman (engl. *decreasing water level*) – postepeno spuštanje, tj. oduzimanje vode u pravilnim vremenskim razmacima; početna zapremina vode je bila 10 L, voda se oduzimala svakog petog dana za 30%, počevši od petog dana eksperimenta (Lind i Johansson, 2007). Oduzimanje vode se završilo petnaestog dana eksperimenta, nakon čega je zapremina vode bila konstantna sa 3.5 L vode, i visinom vodenog stuba 3.3 cm.
3. L tretman (engl. *low water level*) – konstantno niski vodeni uslovi; sa zapreminom vode od 3.5 L, i visinom vodenog stuba 3.3 cm.

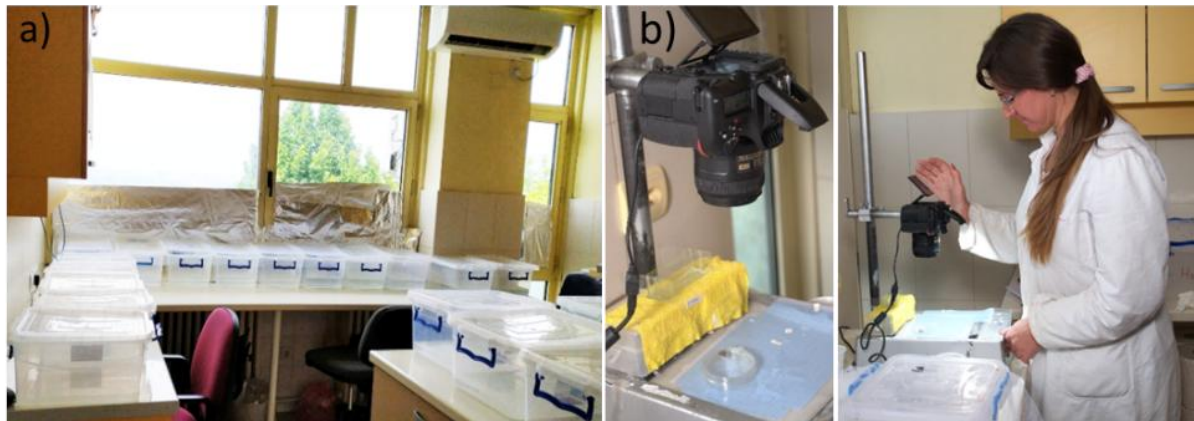
Tabela 1. Prikaz broja jedinki u eksperimentu br. 1.

Tretman	Br. jedinki po kutiji	Br. ponovaka	Br. jedinki po tretmanu
H	7	11	77
D	7	11	77
L	7	11	77
Ukupno	21	33	231



Slika 12. Šematski prikaz eksperimenta br. 1.

Slika 13. prikazuje izgled laboratorije za vreme trajanja eksperimenta.



Slika 13. Izgled laboratorije u toku trajanja eksperimenta br. 1 (a) i fotografisanje jedinki (b) (foto: A. Urošević).

U **Tabeli 2.** su prikazane sve osobine životne istorije i morfološke osobine koje su merene i izračunate u GS 42 i GS 46.

Tabela 2. Tabelarni prikaz merenih osobina životne istorije i morfoloških osobina u GS 42 i GS 46 u eksperimentu br. 1.

	GS 42 (metamorfozni klimaks)	GS 46 (metamorfoza)
Larvalni period (u danima)	✓	✓
Dužina tela (mm)	✓	✓
Masa (g)	✓	✓
Stopa rasta i razvića (masa/larvalni period)	✓	✓
Kondicioni index (BCI)	✓	✓
Preživljavanje		✓
Dužina trupa	✓	✓
Dužina i oblik repa	✓	
Elementi prednjih i zadnjih ekstremiteta		✓
Dužina i širina glave		✓
Dužina skoka		✓

3.4.1 Statističke analize

Kolmogorov-Smirnov test je pokazao da podaci imaju normalnu raspodelu pa su u skladu sa tim primenjeni parametarski testovi. Jedinke koje su identifikovane kao autlajeri na osnovu Grabovog (engl. *Grubbs*) testa (koji detektuje vrednosti koje odstupaju za više od dve standardne devijacije u okviru grupe), uključene su u analize, jer prema Mausbach i saradnicima (2022) predstavljaju biološki ekstremne vrednosti a ne greške u merenju.

Analize osobina životne istorije u metamorfozi (GS 42 i GS 46)

Osnovni parametri deskriptivne statistike za oba stadijuma (GS 42 i 46) (broj jedinki po tretmanu, srednja vrednost, standardna devijacija) za osobine životne istorije dati su tabelarno u rezultatima (**Tabela 8.**).

Razlike u rastu jedinki po kutijama između tretmana merene na 5 dana do metamorfoznog klimaksa, tj. razlike u srednjim vrednostima masa i dužina tela po kutijama između tretmana, su testirane univarijantnom analizom varijanse (ANOVA testom) sa pratećim Tukijevim HSD post-hoc testom (engl. *The Tukey Honestly Significant Difference (HSD) post-hoc test*). Trajektorije rasta između tretmana ispitane su modelom regresije tipa II, odnosno modelom standardizovanih glavnih osa (engl. *Standardized Major Axis (SMA) regression*) logaritmovanih vrednosti masa i dužina tela u programu SMA-TR. Model standardizovanih glavnih osa je metoda regresione analize koja se koristi za određivanje odnosa između dve promenljive kada su obe varijable podložne greškama u merenju ili varijaciji. Za razliku od obične linearne regresije, koja minimalizuje vertikalna odstupanja (y -odstupanja) od regresione linije, SMA uzima u obzir odstupanja u obe ose (x i y). SMA tretira obe varijable simetrično, odnosno minimalizuje se suma kvadrata odstupanja u obe ose, tako što se određuje najkraća distanca od položaja date tačke do regresione prave, pa se ovaj model smatra najprihvatljivijim za procenu koeficijenata alometrije (Warton i sar., 2006). Značajne razlike u nagibu između tretmana su testirane uobičajenim testom nagiba (engl. *Common slope test*).

Multivarijantna analiza varijanse (MANOVA) je korišćena kako bi se ispitaio efekat tretmana i efekat kutije (kao i njihova interakcija) na sve osobine životne istorije: dužinu tela, masu, larvalni period, stopu rasta i kondicioni indeks posebno za svaki stadijum. Nakon ove analize, urađena je ANOVA analiza. Kako bi se utvrdila značajnost razlika između tretmana u određenoj osobini, korišćen je Tukijev HSD post-hoc test, za one osobine koje su se statistički značajno razlikovale u MANOVA analizi.

Razlika u stopi preživljavanja između tretmana je testirana χ^2 testom koristeći 2×3 hi kvadrat matricu. Hi-kvadrat test (χ^2 test) je statistički test koji se koristi za ispitivanje odnosa između kategorijskih varijabli. Može se koristiti za ispitivanje da li distribucija jedne kategorijske varijable odgovara očekivanoj distribuciji (što predstavlja nultu hipotezu), kao i kada imamo frekvencije dve ili više nezavisnih varijabli i želimo da ustanovimo da li postoji povezanost između njih.. Naša nulta hipoteza u eksperimentu bila je da sve jedinke imaju jednaku verovatnoću preživljavanja, tj. da neće biti razlike u broju preživelih između tretmana. Ovim testom ispitujemo odnos između očekivanog broja preživelih jedinki (da sve prežive) i opaženog broja preživelih jedinki u svakoj od grupa, čime potvrđujemo ili opovrgavamo nultu hipotezu.

Analize morfoloških osobina u metamorfozi (GS 42 i GS 46) i skakačkih performansi na GS 46

Osnovni parametri deskriptivne statistike za oba stadijuma (GS 42 i 46) (broj jedinki po tretmanu, srednja vrednost, standardna devijacija) za morfološke osobine i skakanje dati su tabelarno u rezultatima (**Tabela 11.** i **Tabela 14.**).

Da bi se ispitaio efekat tretmana, efekat kutije i njihova interakcija na morfologiju trupa i repa u GS 42, kao i širinu i dužinu glave i elemente prednjih i zadnjih ekstremiteta u GS 46, urađena je multivarijantna analiza kovarijanse (MANCOVA) na svakom pojedinačnom stadijumu. Cilj ove analize bio je da se utvrdi zavisnost oblika od veličine (alometrijski odnosi) između ispitivanih tretmana. U svim analizama dužina tela korišćena je kao kovarijabla kako bi se kontrolisale razlike u veličini tela između jedinki i sprečio njen uticaj na odnose između zavisnih i nezavisnih varijabli. Nakon MANCOVA testa je na oba stadijuma sprovedene su univarijantne analize kovarijanse (ANCOVA), praćene Tukijevim HSD post-hoc testom kako bi se utvrdile međugrupne razlike u pojedinačnim morfološkim strukturama koje su pokazale statistički značajne razlike u MANCOVA testu. Efekat tretmana na lokomotorne, tj. skakačke performanse jedinki testiran je takođe univarijantnom ANCOVA analizom.. Dužina tela jedinki je korišćena u analizi kao kovarijabla kako bi se uklonio uticaj veličine tela na odnos između nezavisnih i zavisnih varijabli u analizi.

Statističke analize su urađene u programu STATISTICA 10 (StatSoft, Inc., 2011).

Analiza oblika repa na GS 42

Za analizu varijabilnosti u obliku repa između jedinki iz različitih tretmana na GS 42 korišćena je analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis* (PCA)) sa geometrijsko-morfometrijskim pristupom (Bookstein, 1997; Klingenberg, 2010) u programu MorphoJ (Klingenberg, 2011). Geometrijska morfometrija, uz pomoć multivarijantnih statističkih metoda, omogućava proučavanje varijabilnosti oblika i veličine morfoloških struktura, kao i vizualizaciju promena u obliku (npr, Klingenberg, 2013). U geometrijskoj morfometriji je oblik struktura opisan pomoću konfiguracija specifičnih tačaka. Varijable oblika (Prokrustove varijable) se dobijaju Prokrustovom analizom (engl. *Generalized Procrustes Analysis* – GPA), što uključuje Prokrustovu superimpoziciju. Skaliranjem, translacijom i rotacijom uklanjaju se sve razlike uzrokovane veličinom, pozicijom i orijentacijom, pri čemu se zadržavaju samo informacije koje se direktno odnose na oblik. Za procenu veličine strukture opisane specifičnim tačkama, koristi se veličina centroida (engl. *Centroid size* – CS) koja predstavlja meru disperzije specifičnih tačaka u odnosu na centralnu tačku (centroid) date konfiguracije i izračunava se kao kvadratni koren sume kvadrata udaljenosti svake specifične tačke od centra, za sve tačke (Rohlf i Slice 1990; Bookstein, 1997; Dryden i Mardia, 1998; Rohlf, 2000). PCA analizom se niz promenljivih koje opisuju neki uzorak (u ovom slučaju oblik repa punoglavaca) prevodi u skup novih promenljivih koje se označavaju kao glavne komponente (engl. *Principal Components* - PCs). Ova analiza se često primenjuje zato što se najveći deo varijabilnosti uzorka može opisati sa svega nekoliko promenljivih i zato što pruža uvid u načine kovariranja analiziranih promenljivih (Ivanović i Kalezić, 2013). Takođe, najčešće se koristi za analize varijabilnosti neke osobine unutar grupe.

Pošto na analizu variranja oblika može uticati u manjoj ili većoj meri i veličina tela, mora se uzeti u razmatranje i uticaj alometrije. Alometrija predstavlja promene u obliku morfoloških struktura izazvanih promenama u veličini, što značajno može uticati na celokupnu varijaciju oblika (Gould, 1966; Klingenberg, 1998; Shingleton i sar., 2007). Zbog ovih promena može doći do

odstupanja od kanalisane razvojne putanje pa se alometrija može koristiti kao mera stresa (Klingenberg, 2010). Alometrija značajno utiče na evoluciju morfoloških celina, jer promene u veličini utiču na ceo organizam pri čemu se menjaju međusobni odnosi osobina i njihov oblik a sve ove promene su korelisane. Uticaj alometrije je ispitan multivarijantnom regresijom Prokrustovih koordinata na logaritamski transformisanu veličinu repa (CS). Korišćen je permutacioni test sa 10000 ponavljanja kako bi se ispitala statistička značajnost alometrije (Monteiro, 1999). Razlike u obliku repa između tretmana su izračunate pomoću MANOVA testa sa Prokrustovim koordinatama kao zavisnim varijablama i tretmanom kao faktorom.

Kako bi se sumirali i vizualizovali obrasci korelacije između morfoloških struktura po tretmanu na GS 46, urađena je diskriminantna analiza glavnih komponenti (engl. *Discriminant analysis of principal components* - DAPC). DAPC je statistička metoda koja kombinuje dve analize: analizu glavnih komponenti (PCA) i linearno diskriminantnu analizu (LDA). Ova analiza se koristi za identifikaciju i opisivanje grupnih struktura u podacima. PCA se prvo primenjuje kako bi se smanjila dimenzionalnost podataka što olakšava narednu, LDA analizu. Nakon što su podaci redukovani pomoću PCA, LDA se primenjuje na glavne komponente. LDA koristi te komponente da maksimizira razliku između unapred definisanih grupa (u našem slučaju između tretmana), dok minimizuje varijaciju unutar grupa (tj. između jedinki unutar jednog tretmana). Rezultat DAPC analize je set linearnih diskriminanti koje najbolje razdvajaju različite grupe u podacima. DAPC omogućava vizualizaciju grupnih struktura i procenu koliko su grupe međusobno različite.

3.5 Eksperiment II: Utvrđivanje najosetljivijeg perioda razvića na isušivanje staništa u razviću žutotrbog mukača

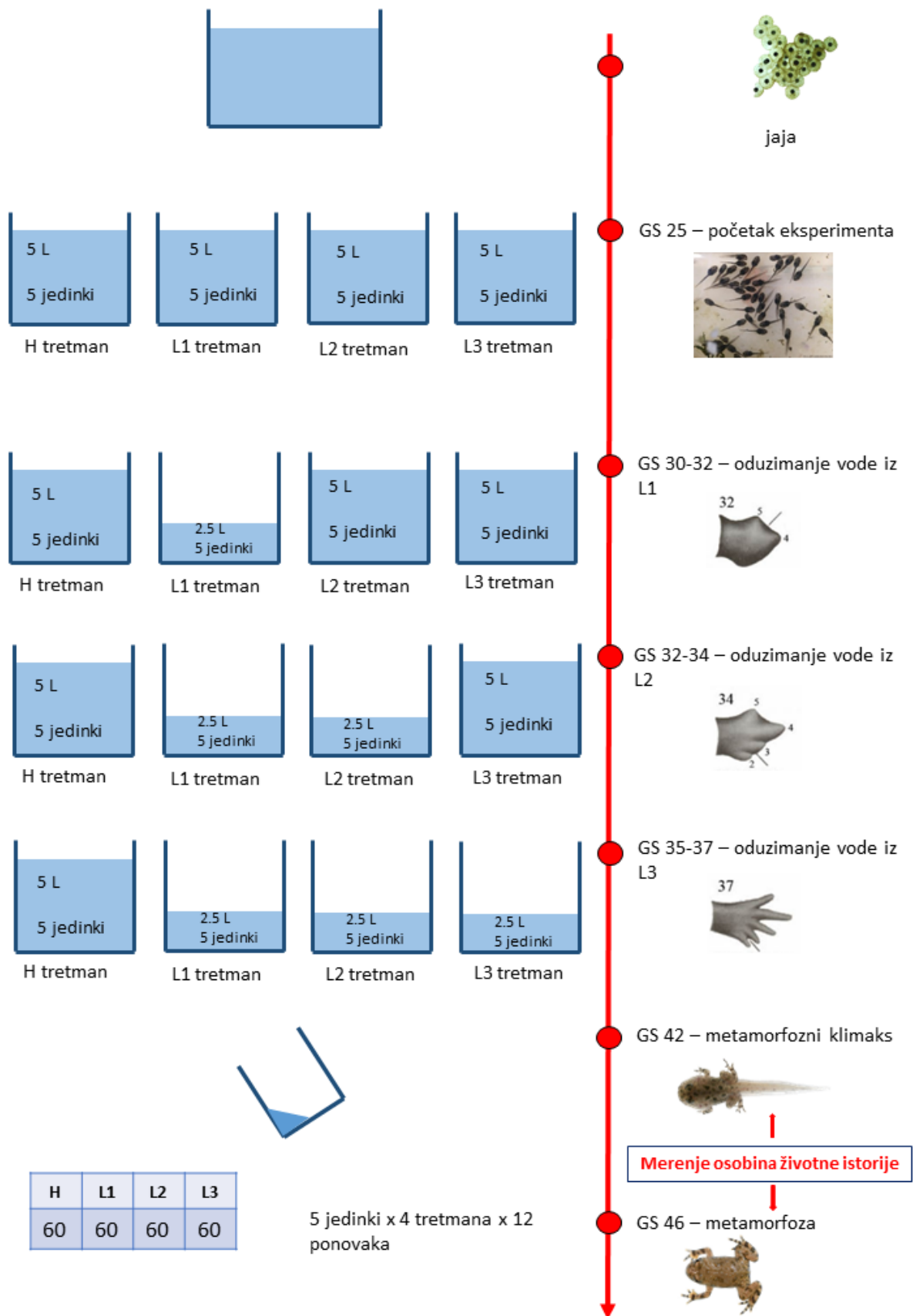
Drugi eksperiment je imao za cilj da ispita da li stepen fenotipske plastičnosti u brzini razvića žutotrbog mukača zavisi od stadijuma razvića u kom su jedinke izložene uslovima sa smanjenom količinom vode (kao što predviđa Travisov model o optimalnom vremenu metamorfoze) i kako se to manifestuje na varijabilnost u drugim osobinama životne istorije i morfološkim osobinama.

Za potrebe ovog eksperimenta, iz prirode je uzeto 12 paketića jaja žutotrbog mukača, pri čemu su jaja gajena zajedno u velikim kutijama sve do GS 25, kada je nasumično odabrano sveukupno 240 jedinki koje su dodeljene jednom od četiri tretmana (**Slika 14.**). Jedinke unutar svakog tretmana su grupno odgajane, po 5 u kutiji, sa 12 ponavljanja po tretmanu, što je ukupno činilo 48 eksperimentalnih kutija (**Tabela 3.**). Tretmani su bili sledeći:

1. H tretman (engl. *high water level*) – konstantno visoki vodeni uslovi; zapremina vode 5 L, i visina vodenog stuba 4.9 cm.
2. L1 tretman (engl. *low water level*) – konstantno visoki vodeni uslovi (5 L) do GS 30-32 (vidljivi začeci zadnjih ekstremiteta) kada se zapremina vode smanjuje na 2.5 L sa dubinom vode od 2.3 cm.
3. L2 tretman (engl. *low water level*) – konstantno visoki vodeni uslovi (5 L) do GS 32-34 (začeci zadnjih ekstremiteta imaju oblik vesla) kada se zapremina vode smanjuje na 2.5 L sa dubinom vode od 2.3 cm.
4. L3 tretman (engl. *low water level*) – konstantno visoki vodeni uslovi (5 L) do GS 35-37 (na zadnjim ekstremitetima se uočava razmak između prstiju) kada se zapremina vode smanjuje na 2.5 L sa dubinom vode od 2.3 cm.

Tabela 3. Prikaz broja jedinki u eksperimentu br. 2.

Tretman	Br. jedinki po kutiji	Br. ponovaka	Br. jedinki po tretmanu
H	5	12	60
L1	5	12	60
L2	5	12	60
L3	5	12	60
Ukupno	20	48	240

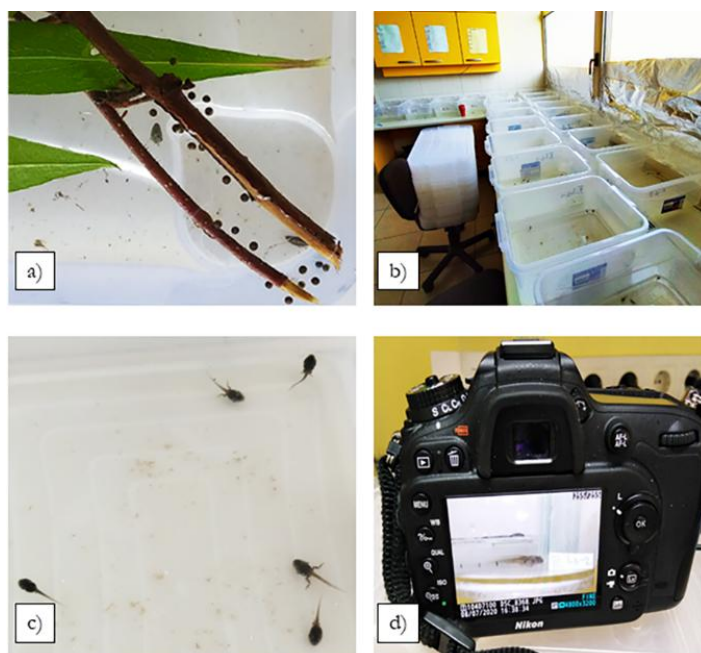


Slika 14. Šematski prikaz eksperimenta br. 2.

U **Tabeli 4.** su prikazane sve osobine životne istorije i morfološke osobine koje su merene i izračunate u GS 42 i GS 46. **Slika 15.** prikazuje izgled laboratorije za vreme trajanja eksperimenta.

Tabela 4. Tabela prikaz merenih osobina životne istorije u GS 42 i GS 46 u eksperimentu br.2.

	GS 42 (metamorfozni klimaks)	GS 46 (metamorfoza)
Larvalni period (u danima)	✓	✓
Dužina trupa (mm)	✓	✓
Dužina repa (mm)	✓	
Masa (g)	✓	✓
Stope rasta i razvića (masa/larvalni period)	✓	✓
Kondicioni index (BCI)	✓	✓
Preživljavanje		✓



Slika 15. Prikaz različitih faza rada za vreme trajanja eksperimenta br. 2. a) Grančice sa jajima žutotrbog mukača tek donetim iz prirode; b) Izgled laboratorije za vreme trajanja eksperimenta; c) Punoglavci u eksperimentalnoj kutiji; d) Fotoaparat kojim su fotografisane jedinke dorzalno u GS 42 i GS 46 (foto: N. Tomašević Kolarov i A. Radmilović).

3.5.1 Statističke analize

Analize osobina životne istorije u metamorfozi (GS 42 i GS 46)

Osnovni parametri deskriptivne statistike na oba stadijuma (GS 42 i 46) (broj jedinki po tretmanu, srednja vrednost, standardna devijacija) za osobine životne istorije dati su tabelarno u rezultatima (**Tabela 18.**).

Statističke analize za osobine životne istorije su sprovedene u programu R, verzija 4.4.1 (R Development Core Team). Normalnost raspodele reziduala je proverena, zatim i potvrđena primenom Kolmogorov-Smirnov testa (funkcija *lillie.test*, “nortest” paket, verzija 1.0–2).

Podaci su analizirani primenom linearnih mešovutih modela (engl. *Linear mixed-effect models* - LMM). Ovi modeli predstavljaju proširenu formu linearnih regresionih modela čime se omogućava analiza podataka sa složenom strukturom, naročito kada postoji zavisnost između pojedinačnih merenja ili kada su podaci hijerarhijski organizovani (npr. više nivoa merenja po jedinki ili grupi). LMM kombinuju fiksne (npr. tretman) i slučajne efekte (npr. individualne razilke), što omogućava fleksibilnost i preciznije modelovanje stvarnih bioloških procesa. Na ovaj ovi modeli pružaju pouzdanije procene uticaja nezavisnih varijabli na zavisnu varijablu, uzimajući u obzir i varijabilnost unutar i između grupa.

U ovom eksperimentu su LMM urađeni pomoću funkcije *lmer* u programu R korišćenjem funkcije *lmer* iz paketa *lme4* (model tipa III, metod procene parametara: engl. *Restricted maximum likelihood* - REML; maksimalno 100 iteracija; Bates i sar., 2007). Tretman (H, L1, L2 i L3) je uključen kao fiksni faktor. Dužina tela, masa, larvalni period, stopa rasta i kondicioni indeks korišćeni su kao zavisne varijable u pet zasebnih modela po svakom stadijumu (GS 42 i GS 46).

P vrednosti su dobijene primenom *likelihood-ratio* (LRT) testa koji se koristi za poređenje dva ugneždena modela (engl. *nested models*) — jednog složenijeg i jednog jednostavnijeg. Ugneždeni modeli su takvi da složeniji model sadrži sve parametre jednostavnijeg, uz dodatne efekte (npr. slučajne efekte). LRT ispituje da li uključivanje dodatnih parametara značajno poboljšava prilagođenost modela podacima. U kontekstu LMM, ovaj test funkcioniše analogno ANOVA testu, jer omogućava procenu značajnosti dodatnih efekata, kao što su slučajni faktori, u objašnjavanju varijabilnosti zavisne varijable. Kako bi se testirala zavisnost podataka, kutija u kojoj su jedinke gajene je uključena kao slučajni (engl. *random*) faktor. Veličina uzorka označena je kao N (ukupan broj analiziranih jedinki), dok n predstavlja ukupan broj testiranih kutija. Nakon primene linearnih mešovityh modela, sprovedeni su post-hoc testovi (Tukijev test; *Tukey HSD* funkcija, multcomp paket) sa Bonferoni korekcijom, kako bi se uporedile sve moguće parne kombinacije tretmana kada je *likelihood-ratio* (LRT) test bio značajan. Statistička značajnost za sve testove i modele određena je pragom $\alpha < 0.05$.

Razlika u stopi preživljavanja između tretmana je testirana χ^2 testom koristeći 2 x 4 hi kvadrat matricu.

Analize morfoloških osobina u GS 42

Da bi se ispitao efekat tretmana i efekat kutije (kao i njihova interakcija) na morfologiju trupa i repa u GS 42 urađena je multivarijantna analiza kovarijanse (MANCOVA) u programu STATISTICA 10 (StatSoft, Inc., 2011) kako bi se ispitala zavisnost oblika od veličine (alometrijski odnosi) između analiziranih tretmana. U ovoj analizi dužina tela korišćena je kao kovarijabla kako bi se kontrolisale razlike u veličini tela između jedinki i sprečio njen uticaj na odnose između zavisnih i nezavisnih varijabli.

3.6 Eksperiment III: Uloga kortikosterona u variranju osobina životne istorije i morfologije žutotrbog mukača u uslovima isušivanja staništa

Treći eksperiment je imao za cilj da utvrdi na koji način isušivanje staništa utiče na nivo hormona stresa kortikosterona u GS 35 i GS 42 i da li su eventualne promene u nivou ovog hormona povezane sa odsustvom ubrzanja razvića žutotrbog mukača u uslovima isušivanja staništa. Takođe, ispitana je veza u nivou kortikosterona u GS 35 i GS 42 i antioksidacionog zaštitnog sistema jedinki. U GS 42 praćen je uticaj isušivanja i nivoa CORT-a na brzinu razvića, druge osobine životne istorije i morfologiju (promene u obliku i dužini repa) jedinki.

GS 35 je izabran za ovaj eksperiment zato što su prethodna istraživanja pokazala da se očekuje da će na ovom stadijumu razvića punoglavcima biti dovoljno razvijen neuroendokrini sistem koji će im omogućiti razvojni prelazak, tj. metamorfozu, pod uslovima isušivanja staništa (Denver, 2009; Gómez Mestre i sar., 2013; Kulkarni i sar., 2017). Takođe, dokazano je da kada se na ovom stadijumu egzogeno dodaju TH i/ili CORT *Pelobates cultripes* i *Spea multiplicata* ubrzavaju svoje razviće (npr. Gómez Mestre i sar., 2013; Kulkarni i sar., 2017). Na osnovu naših rezultata iz prethodna dva eksperimenta, kao i saznanja iz postojeće literature (Böll, 2002; Kapfberger, 1984; Sinsch i sar., 2020), koji su pokazali da žutotrbog mukač ne može da ubrza razviće ni u jednom od više analiziranih tretmana sa manipulacijom vode, želeli smo da ispitamo da li promene u HPI osi mogu biti odgovorne za nepromenjenu brzinu razvića žutotrbog mukača u desikacionim uslovima. A pošto je poznato da je CORT glavni hormon stresa svih kičmenjaka i jedan od ključnih hormona

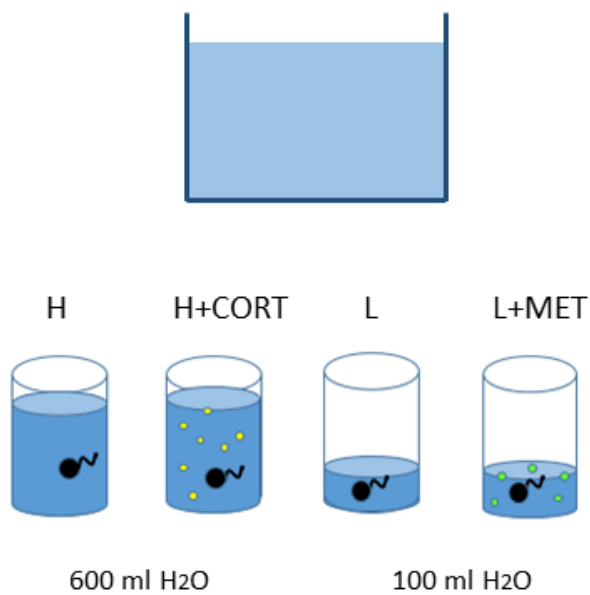
čiji se nivo povećava prilikom aktivacije HPI ose, ovim eksperimentom smo ispitali uticaj manipulacije vodenih uslova na nivoe CORT-a i kako se nivo CORT-a odražava na variranje osobina životne istorije, morfološke i fiziološke osobine jedinki. S obzirom na to da je pokazano da egzogeno dodat CORT može dovesti do ubrzanja razvića u povoljnim uslovima (Glennemeier i Denver, 2002a; Denver, 2013; Kulkarni i sar., 2017), pored konstantno visokih vodenih uslova i konstantno smanjenog nivoa vode, uveli smo i tretman sa egzogeno dodatim CORT-om visokim vodenim uslovima, kako bismo podstakli ubrzanje razvića jedinki, kao i njegov inhibitor sinteze metirapon (MET) u konstantno smanjen nivo vode kako bismo ispitali da li će MET umanjiti negativne efekte endogenog CORT-a na osobine životne istorije u desikacionom tretmanu.

Za potrebe ovog eksperimenta, iz prirode je uzeto 10 paketića jaja žutotrboag mokača. Jedinke su gajene zajedno u kutijama od 30 L sve do GS 35. Na ovom stadijumu je iz kutija nasumično odabrano sveukupno 208 jedinki (**Tabela 5.**) koje su podeljene u četiri grupe, tj. četiri tretmana (**Slika 16.**) i smeštene pojedinačno u kutije koje pripadaju jednom od sledećih tretmana:

1. H tretman (engl. *high water level*) – konstantno visoki vodeni uslovi; sa zapreminom vode od 600 ml i visinom vodenog stuba od 10 cm.
2. L tretman (engl. *low water level*) – konstantno niski vodeni uslovi; sa zapreminom vode od 100 ml, i visinom vodenog stuba 1.66 cm.
3. H+CORT (engl. *high water level* + kortikosteron) – konstantno visoki vodeni uslovi sa 100 nM egzogenog kortikosterona; sa zapreminom vode od 600 ml i visinom vodenog stuba od 10 cm.
4. L+MET (engl. *low water level* + metirapon) – konstantno niski vodeni uslovi sa 25 μ M egzogenog metirapona; sa zapreminom vode od 100 ml, i visinom vodenog stuba 1.66 cm.

Tabela 5. Prikaz broja jedinki u eksperimentu br. 3.

Tretman	Br. jedinki po tretmanu na početku eksperimenta (GS 35)	Br. jedinki nakon I žrtvovanja (24 h) (GS 35)
H	52	26
L	52	26
H+CORT	52	26
L+MET	52	26
Ukupno	208	104



- **CORT- 100 nM** kortikosterona
- **MET- 25 μM** metirapona (inhibitor sinteze kortikosterona)

H	H+CORT	L	L+MET
52	52	52	52

Broj jedinki po tretmanu na početku eksperimenta (GS 35)



žrtvovanje nakon 24 h

H	H+CORT	L	L+MET
26	26	26	26

Broj jedinki po tretmanu koje su nastavile razviće do GS 42 i koje su žrtvovane u GS 42 zbog fizioloških parametara



jaja

Prometamorfoza (GS 35) – početak eksperimenta



nakon 24 h - žrtvovanje polovine uzorka radi merenja CORT-a i parametara oksidacionog stresa

GS 42 – metamorfozni klimaks



- merenje osobina životne istorije
- merenje promena u obliku repa
- merenje CORT-a i enzima antioksidacionog sistema

Slika 16. Šematski prikaz eksperimenta br. 3.

Za eksperimentalne tretmane korišćeni su rastvori sa različitim nivoima vode i dodatkom hormona kortikosterona (CORT) ili inhibitora njegove sinteze, metirapona (MET). Finalna koncentracija CORT-a u tretmanu sa visokim nivoom vode (H+CORT) iznosila je 100 nM, dok je koncentracija MET-a u tretmanu sa niskim nivoom vode (L+MET) bila 25 μ M. Pošto se CORT rastvara u 99.8% etanolu, ista koncentracija etanola (0.0011% ukupne zapremine vode po kutiji) dodata je i u ostale tretmane (H, L i L+MET), kako bi svi tretmani bili standardizovani po pitanju prisustva rastvarača.

Nivo kortikosterona i parametri oksidacionog stresa izmereni su u GS 35, dok su u GS 42 pored ove dve fiziološke osobine zabeležene i osobine životne istorije i morfološke osobine. (Tabela 6.).

Tabela 6. Tabelarni prikaz merenih osobina u GS 35 i GS 42 u eksperimentu br. 3.

	GS 35 (prometamorfoza)	GS 42 (metamorfozni klimaks)
Larvalni period (u danima)		✓
Dužina trupa (mm)		✓
Dužina repa (mm)		✓
Masa (g)		✓
Stope rasta i razvića (masa/larvalni period)		✓
Kondicioni index (BCI)		✓
Preživljavanje		✓
Oblik repa		✓
Nivo CORT-a	✓	✓
Parametri oksidacionog stresa	✓	✓

3.6.1 Statističke analize

Kolmogorov-Smirnov test je pokazao da podaci imaju normalnu raspodelu pa su u skladu sa tim rađeni parametarski testovi.

Analize osobina životne istorije u GS 42 i fizioloških osobina u GS 35 i GS 42

Osnovni parametri deskriptivne statistike na GS 42 (broj jedinki po tretmanu, srednja vrednost, standardna devijacija) za osobine životne istorije dati su tabelarno u rezultatima (**Tabela 23.**).

U GS 42 je urađena jednofaktorska MANOVA kako bi se ispitaio celokupan efekat tretmana na sve osobine životne istorije koje su se ispitivale na ovom stadijumu (ukupna dužina tela, masa, larvalni period, stopa rasta i kondicioni indeks). Nakon toga je urađena jednofaktorska ANOVA praćena Tukijevim post-hoc testovima sa Bonferoni korekcijom (gde je to potrebno), kako bi se ispitalo koje se osobine razlikuju između grupa.

Da bi se analizirao efekat različitih vodenih uslova na nivoe CORT-a u GS 35 i GS 42, urađena je jednofaktorska ANOVA na svakom pojedinačnom stadijumu zbog toga što tretmani u GS 35 i GS 42 nisu bili konzistentni kroz oba stadijuma. Da bismo održali statističku rigoroznost i osigurali validnost naših rezultata, odlučili smo da isključimo određene tretmane iz analize sadržaja nivoa kortikosterona na oba stadijuma (isključen je tretman H+CORT na GS 35 i H na GS 42 zbog toga što su nivoi CORT-a za ova dva tretmana bili izvan opsega RIA standardne krive). ANOVA analiza je praćena Tukijevim post-hoc testovima sa Bonferoni korekcijom (gde je to potrebno) kako bismo se fokusirali na uticaj tretmana unutar svakog stadijuma (GS 35 i GS 42).

Kako bi se analizirali efekti tretmana na parametre oksidacionog stresa u GS 35 i GS 42, korišćena je dvofaktorska multivarijantna analiza varijanse (dvofaktorska MANOVA) gde su faktori bili tretman i stadijum razvića. Nakon ove analize, urađena je dvofaktorska ANOVA praćena Tukijevim post-hoc testovima sa Bonferoni korekcijom (gde je to potrebno), kako bi se identifikovale razlike između grupa.

Statističke analize su urađene u programu STATISTICA 10 (StatSoft, Inc., 2011).

Stopa preživljavanja između tretmana je testirana χ^2 testom koristeći 2 x 4 hi kvadrat matricu.

Analize morfoloških osobina u GS 42

Kako bi se procenio ukupni efekat variranja kortikosterona i različitih vodenih uslova na dužinu trupa i repa jedinki na GS 42, korišćena je multivarijantna analiza kovarijanse (jednofaktorska MANCOVA, gde je faktor tretman) kako bi se ispitali alometrijski odnosi između analiziranih tretmana, sa veličinom tela kao kovarijablom kako veličina ne bi uticala na odnose između nezavisnih i zavisnih varijabli u analizi.

Nakon ove analize je urađena univarijantna ANCOVA praćena Tukijevim post-hoc testovima sa Bonferoni korekcijom (gde je to potrebno), izvedene su kako bi se utvrdilo koje osobine koje se razlikuju između grupa.

Analiza oblika repa u GS 42

Da bi se ispitala varijabilnost u obliku repa između jedinki iz različitih tretmana na GS 42 korišćena je PCA analiza u programu MorphoJ (Klingenberg, 2011). Uticaj alometrije je ispitan multivarijantnom regresijom Prokrustovih koordinata na logaritamski transformisanu veličinu repa (CS). Korišćen je permutacioni test sa 10000 ponavljanja kako bi se ispitala statistička značajnost alometrije (Monteiro, 1999). Razlike u obliku repa između tretmana su izračunate pomoću MANOVA testa sa Prokrustovim koordinatama kao zavisnim varijablama i tretmanom kao faktorom.

4. REZULTATI

4.1 Eksperiment I: Utvrđivanje sposobnosti žutotrbog mukača da ubrza razviće u uslovima isušivanja staništa

Rezultati ove teze vezani za utvrđivanje sposobnosti žutotrbog mukača da ubrza svoje razviće u isušujućim uslovima staništa publikovani su u radu Kijanović, A., Vukov, T., Mirč, M., Krizmanić, I., i Tomašević Kolarov, N. (2023). Inability of yellow-bellied toad to accelerate metamorphosis in desiccation conditions. *Journal of Zoology*, **320(2)**, 96–107.

4.1.1 Osobine životne istorije

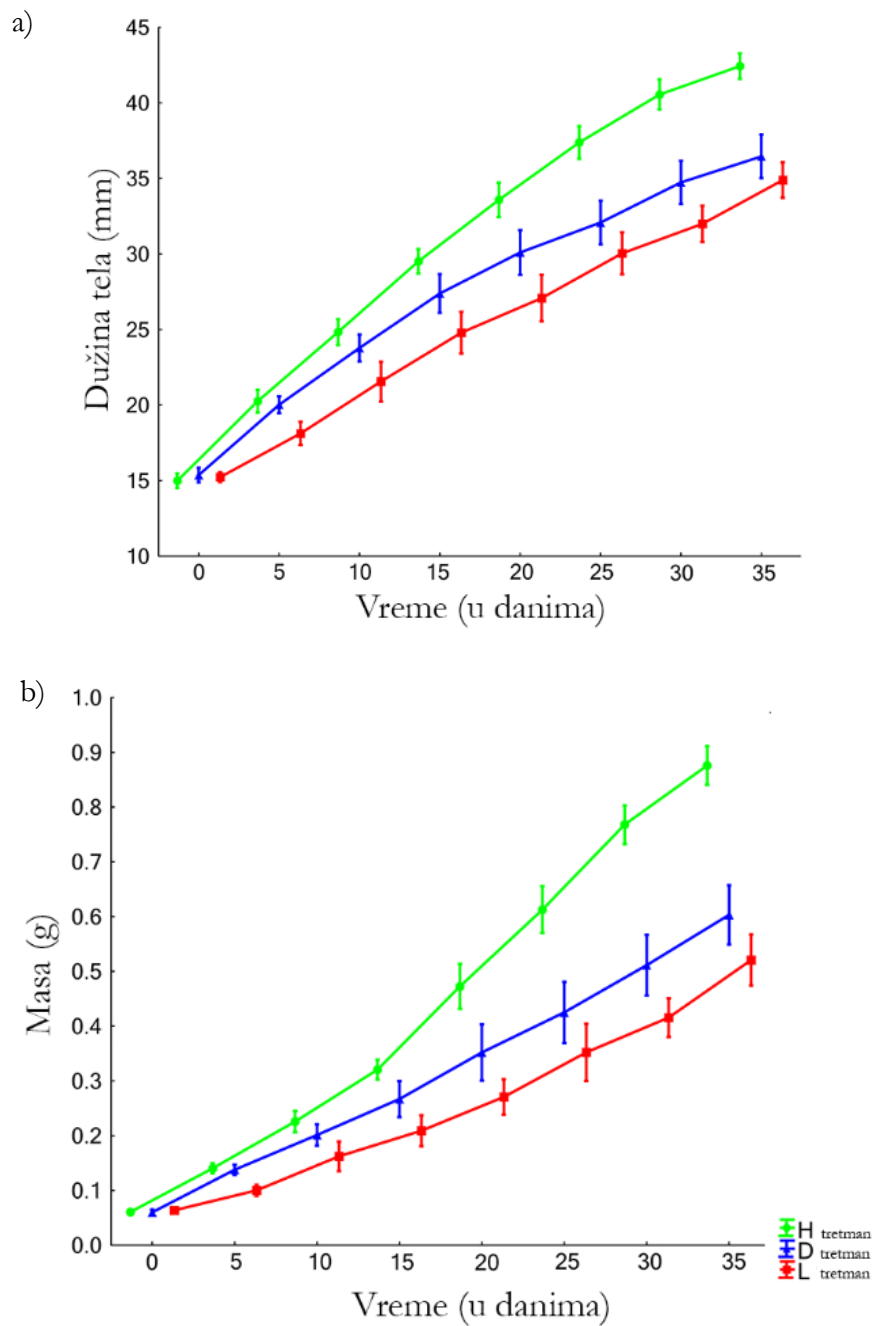
4.1.1.1 Grupni rast jedinki do metamorfoznog klimaksa (GS 42)

Deskriptivna statistika grupnog rasta jedinki do GS 42 je prikazana u **Tabeli 7**.

Rezultati ANOVA testa kada je u pitanju grupni rast jedinki, su pokazali da su jedinke gajene u L tretmanu imale značajno kraću dužinu tela i manju masu u poređenju sa drugim tretmanima (H i D). Ovo je primećeno već petog dana eksperimenta (post-hoc testovi – L/D, L/H: $p < 0.01$; H/D: $p > 0.05$ za obe osobine, i dužinu tela i masu). Isti trend se nastavio do 15. dana eksperimenta. Nakon toga, jedinke iz H tretmana imale su najveću dužinu tela i najveću masu (**Tabela 7**), dok se jedinke gajene u D i L tretmanu nisu statistički razlikovale ni u dužini tela ni u masi (post-hoc testovi – H/D, H/L: $p < 0.01$; D/L: $p > 0.05$ za obe osobine, i dužinu tela i masu) (**Slika 17**).

Tabela 7. Deskriptivna statistika prosečnih vrednosti ukupne dužine tela (a) i mase (b) jedinki po tretmanima tokom vremena merena svaki peti dan od početka eksperimenta sve dok prve jedinke nisu ušle u metamorfozni klimaks (GS 42). H - konstantno visok nivo vode; D - opadajući nivo vode/desikacioni tretman; L - konstantno nizak nivo vode. SV - srednja vrednost; SD - standardna devijacija.

a) Dužina tela (mm)				b) Masa (g)		
Dan eksperimenta	Tretman	SV	SD	Broj kutija	SV	SD
0	H	14.99	0.71	11	0.06	0.01
	D	15.37	0.72	11	0.06	0.01
	L	15.24	0.48	11	0.06	0.00
5	H	20.26	1.12	11	0.14	0.01
	D	20.02	0.82	11	0.14	0.01
	L	18.13	1.13	11	0.10	0.02
10	H	24.83	1.27	11	0.23	0.03
	D	23.78	1.32	11	0.20	0.03
	L	21.56	1.95	11	0.16	0.04
15	H	29.51	1.20	11	0.32	0.03
	D	27.39	1.90	11	0.27	0.05
	L	24.79	2.06	11	0.21	0.04
20	H	33.58	1.70	11	0.47	0.06
	D	30.10	2.19	11	0.35	0.08
	L	27.09	2.28	11	0.27	0.05
25	H	37.38	1.61	11	0.61	0.06
	D	32.09	2.15	11	0.42	0.08
	L	30.04	2.07	11	0.35	0.08
30	H	40.56	1.49	11	0.77	0.05
	D	34.74	2.12	11	0.51	0.08
	L	31.99	1.78	11	0.42	0.05
35	H	42.43	1.25	11	0.88	0.05
	D	36.46	2.15	11	0.60	0.08
	L	34.89	1.75	11	0.52	0.07



Slika 17. Prosečna dužina tela (a) i masa (b) punoglavaca za sva tri tretmana do metamorfoznog klimaksa. H - konstantno visok nivo vode (zeleno); D - opadajući nivo vode/desikacioni tretman (plavo); L - konstantno nizak nivo vode (crveno).

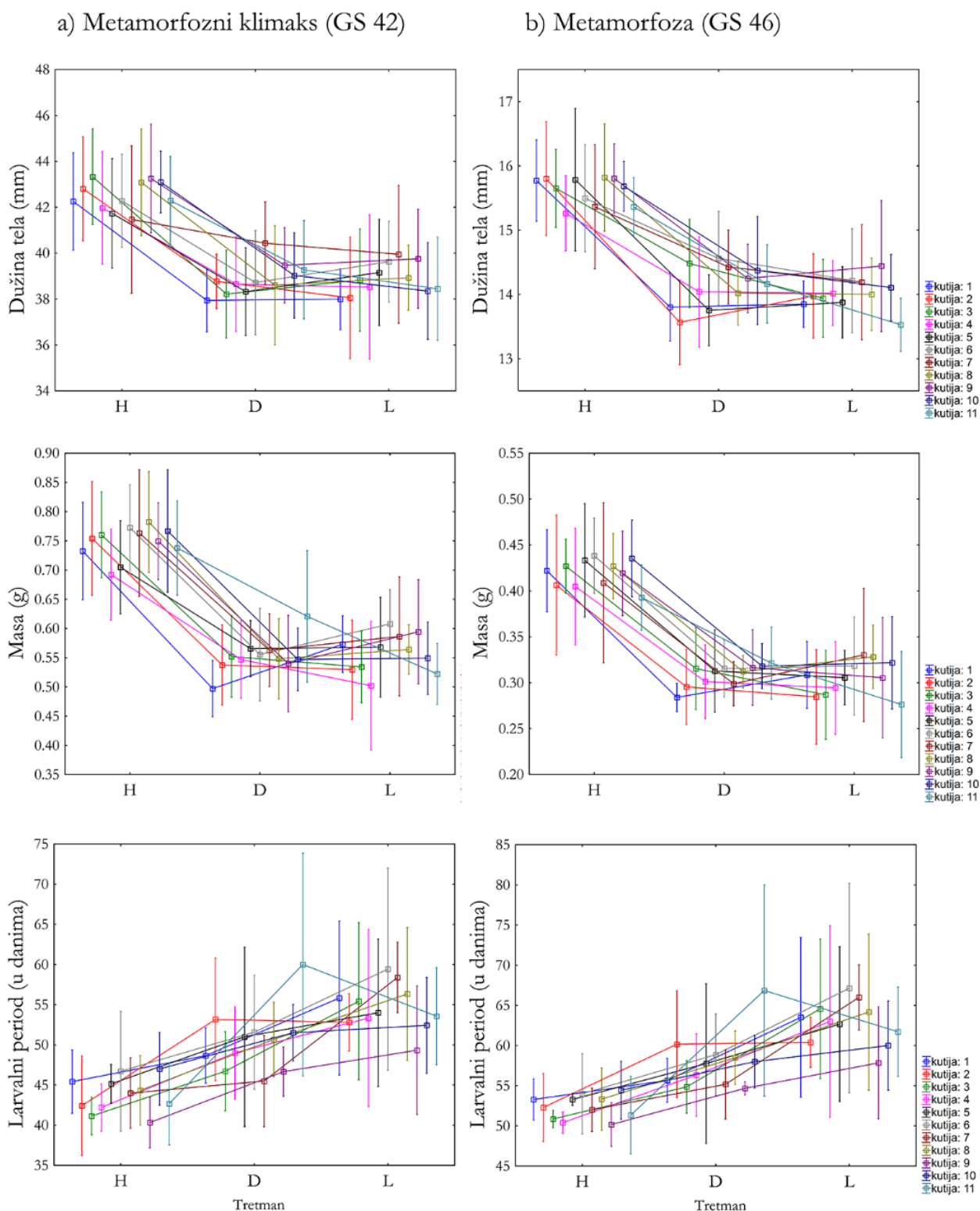
Regresija modelom standardizovanih glavnih osa (SMA) log-transformisanih vrednosti mase na dužinu tela jedinki, je pokazala da jedinke iz oba desikaciona tretmana (D i L) imaju zajednički nagib sa jedinkama koje su gajene u konstantno visokim uslovima vode (H tretman). Vrednosti nagiba po svakom tretmanu su bile: H = 2.519, D = 2.580, L = 2.512; pri čemu je $p = 0.257$.

4.1.1.2 Osobine životne istorije pod uticajem različitih vodenih uslova u metamorfoznom klimaksu (GS 42) i metamorfozi (GS 46)

Deskriptivna statistika osobina životne istorije na oba stadijuma je prikazana u **Tabeli 8.**, a **Slika 18.** prikazuje norme reakcije srednjih vrednosti po kutijama dužine tela, mase i larvalnog perioda posmatranih u tri tretmana (H, D, L) u metamorfoznom klimaksu i metamorfozi.

Tabela 8. Deskriptivna statistika osobina životne istorije u metamorfoznom klimaksu (a) i metamorfozi (b) žutotrbug mukača. Jedinke su gajene u različitim vodenim uslovima: H - konstantno visok nivo vode; D - opadajući nivo vode; L - konstantno nizak nivo vode. N - broj jedinki po tretmanu; SV - srednja vrednost; SD - standardna devijacija.

	a) Metamorfozni klimaks (GS 42)				b) Metamorfoza (GS 46)		
	Tretman	N	SV	SD	N	SV	SD
Dužina tela (mm)	H	72	42.50	2.19	72	15.62	0.72
	D	67	38.86	1.89	67	14.15	0.68
	L	68	38.86	2.16	67	14.00	0.64
Masa (g)	H	72	0.74	0.08	72	0.42	0.05
	D	67	0.55	0.07	67	0.30	0.03
	L	68	0.55	0.07	67	0.30	0.05
Larvalni period (u danima)	H	72	43.86	4.73	72	52.38	3.36
	D	67	50.49	7.71	67	58	6.70
	L	68	54.63	8.40	67	62.83	8.39
Stopa rasta	H	72	17.24	2.46	72	8.04	1.03
	D	67	11.12	1.91	67	5.36	0.69
	L	68	10.34	1.62	67	4.92	0.93
Kondicioni indeks (BCI)	H	72	0.13	0.08	72	0.03	0.10
	D	67	-0.07	0.10	67	-0.02	0.10
	L	68	-0.06	0.10	67	-0.01	0.11



Slika 18. Prikaz normi reakcija srednjih vrednosti sa standardnim devijacijama (± 1 SD) po kutijama za dužinu tela, masu i larvalni period u metamorfoznom klimaksu (a) i metamorfozi (b) jedinki žutotrbovog mukača odgajanih u različitim vodenim uslovima, odnosno u tri različite sredine. H - konstantno visok nivo vode; D - opadajući nivo vode/desikacioni tretman; L - konstantno nizak nivo vode.

Rezultati MANOVA testa su pokazali da su različiti vodeni uslovi u kojima su jedinke gajene imali značajne efekte na sve osobine životne istorije koje su analizirane: ukupnu dužinu tela (GS

42) i dužinu tela u metamorfozi (GS 46), masu, larvalni period, stopu rasta i kondicioni indeks na oba stadijuma (GS 42 i GS 46), bez efekata kutije i interakcije tretman*kutija na zajedničku varijabilnost između ovih ispitivanih osobina (**Tabela 9.**).

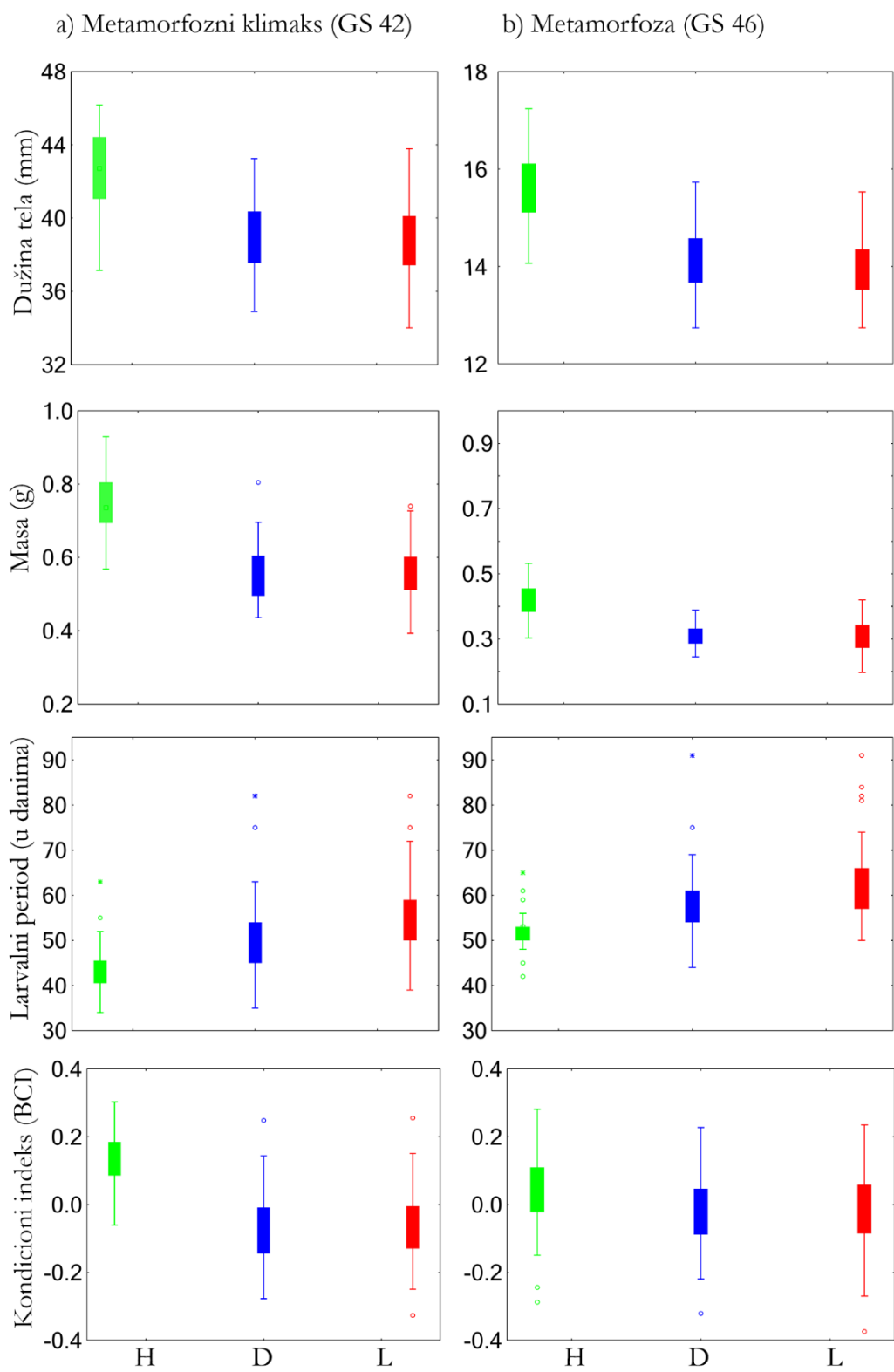
Tabela 9. Rezultati multivarijantnih analiza varijanse (MANOVA) za osobine životne istorije u metamorfoznom klimaksu (GS 42) (a) i metamorfozi (GS 46) (b). Statistički značajne razlike su istaknute podebljanim p vrednostima.

	Wilks value	F	df1	df2	<i>p</i>
(a)	GS 42: dužina tela+masa+larvalni period+stopa rasta+kondicioni indeks				
Tretman	0.1654	49.60	10	340.0	<0.001
Kutija	0.7236	1.14	50	778.6	0.2337
Tretman*Kutija	0.5612	1.05	100	834.0	0.3612
(b)	GS 46: dužina tela+masa+larvalni period+stopa rasta+kondicioni indeks				
Tretman	0.22285	36.9	10	338.0	<0.001
Kutija	0.7768	0.90	50	774.1	0.7052
Tretman*Kutija	0.6094	0.90	100	829.1	0.7754

ANOVA analiza je pokazala da su punoglavci u tretmanima isušivanja (D i L) imali značajno manju ukupnu dužinu tela i masu od punoglavaca gajenih u H tretmanu, bez razlike između D i L tretmana u GS 42. Isti obrazac je primećen kod metamorfa za dužinu tela i masu u GS 46 (**Slika 19., Tabela 10.**).

Punoglavci/metamorfi gajeni u stresnim vodenim uslovima (D i L tretman) su imali značajno duži larvalni period i sporiji rast do metamorfoze u odnosu na jedinke gajene u H tretmanu pri čemu su srednje vrednosti punoglavaca/metamorfa iz D tretmana bile između vrednosti H i L tretmana i u GS 42 i u GS 46 (**Slika 19., Tabela 10.**). Jedinke iz L tretmana produžile su svoj larvalni period za prosečno 11 dana (24.5%) u odnosu na jedinke iz H tretmana, dok su jedinke iz D tretmana produžile svoj larvalni period za prosečno 7 dana (15%) u odnosu na jedinke iz H tretmana.

Kondicioni indeks na oba stadijuma je imao najviše vrednosti u H tretmanu, i značajno manje vrednosti kod punoglavaca i metamorfa u stresnim tretmanima isušivanja (D i L), bez razlike između D i L tretmana i u GS 42 i GS 46 (**Slika 19., Tabela 10.**).



Slika 19. Grafički prikaz srednjih vrednosti osobina životne istorije (dužine tela, mase, dužine larvalnog perioda i kondicionog indeksa) jedinki žutotrboog mukača prikazanih boks-plot graficima u (a) metamorfoznom klimaksu (GS 42) i (b) metamorfozi (GS 46). Jedinke su gajene u različitim tretmanima: H - konstantno visok nivo vode; D - opadajući nivo vode; L - konstantno nizak nivo vode.

Tabela 10. ANOVA test osobina životne istorije u metamorfoznom klimaksu (a) i metamorfozi (b) praćen Tukijevim pos-hoc testovima na oba stadijuma. Jedinke su gajene u različitim vodenim uslovima: H - konstantno visok nivo vode; D - opadajući nivo vode; L - konstantno nizak nivo vode. Statistički značajne razlike su istaknute podebljanim p vrednostima.

a) Metamorfozni klimaks (GS 42)					
	Tretman	F	<i>p</i>	Poređenje između tretmana	<i>post-hoc p</i>
Dužina tela (mm)	H	70.95	<0.001	H/D	<0.001
	D			H/L	<0.001
	L			D/L	1.0000
Masa (g)	H	144.79	<0.001	H/D	<0.001
	D			H/L	<0.001
	L			D/L	0.9444
Larvalni period (u danima)	H	41.21	<0.001	H/D	<0.001
	D			H/L	<0.001
	L			D/L	<0.001
Stopa rasta	H	242.04	<0.001	H/D	<0.001
	D			H/L	<0.001
	L			D/L	0.0673
Kondicioni indeks (BCI)	H	101.57	<0.001	H/D	<0.001
	D			H/L	<0.001
	L			D/L	0.5650
b) Metamorfoza (GS 46)					
Dužina tela (mm)	H	119.9	<0.001	H/D	<0.001
	D			H/L	<0.001
	L			D/L	0.4296
Masa (g)	H	139.7	<0.001	H/D	<0.001
	D			H/L	<0.001
	L			D/L	0.9146
Larvalni period (u danima)	H	45.84	<0.001	H/D	<0.001
	D			H/L	<0.001
	L			D/L	<0.001
Stopa rasta	H	246.07	<0.001	H/D	<0.001
	D			H/L	<0.001
	L			D/L	<0.001
Kondicioni indeks (BCI)	H	5.98	<0.001	H/D	0.0060
	D			H/L	0.0270
	L			D/L	0.9088

4.1.1.3 Preživljavanje jedinki od početka eksperimenta (GS 25) do metamorfoze (GS 46)

Stopa preživljavanja u toku eksperimenta je bila relativno visoka. Na početku eksperimenta ukupan broj jedinki je iznosio 231 pri čemu je 10,38% jedinki uginulo pre metamorfoze. Mortalitet je bio prisutan u svim tretmanima. Najveći mortalitet zabeležen je u D tretmanu (10 od 77 jedinki; 12,98%), zatim u L tretmanu (9 od 77 jedinki; 11,68%) i H tretmanu (5 od 77 jedinki; 6,49%). Međutim, ove razlike između tretmana nisu bile statistički značajne ($\chi^2 = 0,106$, $p = 0,948$).

4.1.2 Morfološke osobine

4.1.2.1 Morfološke osobine jedinki pod uticajem različitih vodenih uslova u metamorfoznom klimaksu (GS 42)

Deskriptivna statistika morfoloških osobina u metamorfoznom klimaksu je data u **Tabeli 11**.

Tabela 11. Deskriptivna statistika morfoloških osobina (dužina trupa i repa) u metamorfoznom klimaksu (GS 42). Jedinke su gajene u različitim vodenim uslovima: H - konstantno visok nivo vode; D - opadajući nivo vode; L - konstantno nizak nivo vode. N - broj jedinki po tretmanu; SV - srednja vrednost; SD - standardna devijacija.

Metamorfozni klimaks (GS 42)	Tretman	N	SV	SD
Dužina trupa	H	72	15.8	0.80
	D	67	14.4	0.70
	L	68	14.2	0.82
Dužina repa	H	72	26.8	1.85
	D	67	24.4	1.50
	L	68	24.6	1.85

Rezultati MANCOVA testa su pokazali da je tretman značajno uticao na zajedničku varijabilnost između dužine trupa i repa, bez efekata kutije i interakcije tretman*kutija što se može videti u **Tabeli 12**.

Tabela 12. Rezultati multivarijantne analize kovarijanse (MANCOVA) za morfološke osobine (dužina trupa i repa) u metamorfoznom klimaksu (GS 42) jedinki žutotrbovog mukača gajenih u različitim vodenim uslovima. Statistički značajne razlike su istaknute podebljanim p vrednostima.

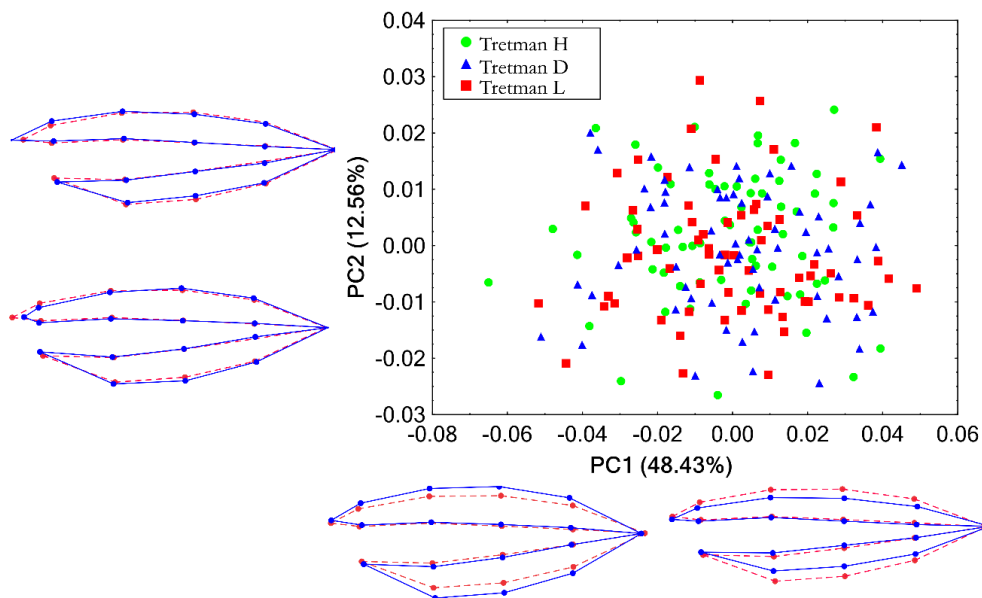
	Wilks value	F	df1	df2	<i>p</i>
GS 42: trup + rep					
Dužina tela	0.4240	116.82	2	172.0	<0.001
Tretman	0.8087	9.6297	4	344.0	<0.001
Kutija	0.9607	0.3480	20	344.0	0.9965
Tretman*Kutija	0.8609	0.67	40	344.0	0.9392

Jednofaktorska ANCOVA je pokazala da su jedinke gajene u tretmanima isušivanja (D i L) imale značajno kraći trup od jedinki gajenih u H tretmanu, pri čemu nije postojala razlika u dužini trupa između D i L tretmana. Međutim, kada je dužina repa u pitanju, nisu uočene razlike između tretmana (**Tabela 13.**).

Tabela 13. Analiza kovarijanse (ANCOVA) za morfološke osobine (dužina trupa i repa) u metamorfoznom klimaksu (GS 42) žutotrbug mukača. Dužina tela je korišćena kao kovarijabla. Statistički značajne razlike su istaknute podebljanim p vrednostima. N - broj jedinki po tretmanu; SV - srednja vrednost; SD - standardna devijacija.

Metamorfozni klimaks (GS 42)	Tretman	F	<i>p</i>	Poređenje između tretmana	<i>post-hoc p</i>
Dužina trupa	H	21.54	<0.001	H/D	<0.001
	D			H/L	<0.001
	L			D/L	0.1210
Dužina repa	H	0.48	0.6136	H/D	/
	D			H/L	/
	L			D/L	/

Analiza glavnih komponenti (PCA) je pokazala da su prva i druga osa glavnih komponenti opisale 61,01% ukupne varijabilnosti u obliku repa sa velikim preklapanjem između grupa (**Slika 20.**). MANOVA test nije pokazao razlike u obliku repa između tretmana (Wilks' vrednost = 0,6722, F = 1, df = 60, 338, $p = 0,1260$).



Slika 20. Analiza glavnih komponenti (PCA). Položaj metamorfa u morfoprostoru definisanim sa prve dve ose glavnih komponenti. Crvene isprekidane linije predstavljaju prosečan oblik repa jedinki žutotrbug mukača; plave linije predstavljaju svaki oblik repa na ekstremnim vrednostima osa glavnih komponenti. Kod boja: zeleno - H tretman; plavo - D tretman; crveno - L tretman. Položaj tačaka i polutačaka na repu je prikazan na **Slici 9.**

4.1.2.2 Morfološke osobine i skakačke performanse jedinki pod uticajem različitih vodenih uslova u metamorfozi (GS 46)

Deskriptivna statistika morfoloških osobina i skakačkih performansi jedinki u metamorfozi (GS 46) prikazani su u **Tabeli 14**.

Tabela 14. Deskriptivna statistika morfoloških osobina i skakačkih performansi jedinki u metamorfozi (GS 46). Jedinke su gajene u različitim vodenim uslovima: H - konstantno visok nivo vode; D - opadajući nivo vode; L - konstantno nizak nivo vode. N - broj jedinki po tretmanu; SV - srednja vrednost; SD - standardna devijacija.

(a) Morfološke osobine u metamorfozi (GS 46)	Tretman	N	SV	SD
Dužina glave	H	72	6.1	0.20
	D	67	5.8	0.27
	L	67	5.7	0.33
Širina glave	H	72	7.4	0.53
	D	67	7.2	0.27
	L	67	6.9	0.65
Stilopodijalni deo	H	72	2.5	0.39
	D	67	2.4	0.29
	L	67	2.4	0.35
Distalni deo prednjih ekstremiteta	H	72	7.5	0.46
	D	67	6.8	0.44
	L	67	6.8	0.60
Stilopodijalni deo zadnjeg ekstremiteta	H	72	7.5	0.43
	D	67	6.7	0.37
	L	67	6.7	0.52
Zeugopodijalni deo zadnjeg ekstremiteta	H	72	6.4	0.35
	D	67	5.8	0.36
	L	67	5.7	0.48
Skočni deo	H	72	3.7	0.56
	D	67	3.2	0.59
	L	67	3.1	0.66
Distalni deo stopala	H	72	6.6	0.60
	D	67	6.0	0.59
	L	67	6.0	0.69
b) Skakačke performanse				
Maksimalan skok	H	30	107.7	17.14
	D	30	97.3	18.14
	L	30	89.2	13.80

Rezultati MANCOVA analize za morfološke osobine su pokazali da je tretman značajno uticao na zajedničku varijabilnost glave i prednjih i zadnjih ekstremiteta (**Tabela 15**).

Tabela 15. Rezultati multivarijantne analize kovarijanse (MANCOVA) za morfološke osobine (dužina i širina glave i dužine delova prednjih i zadnjih ekstremiteta) u metamorfozi (GS 46) jedinki žutotrbug mukača gajenih u različitim vodenim uslovima. Statistički značajne razlike su istaknute podebljanim p vrednostima.

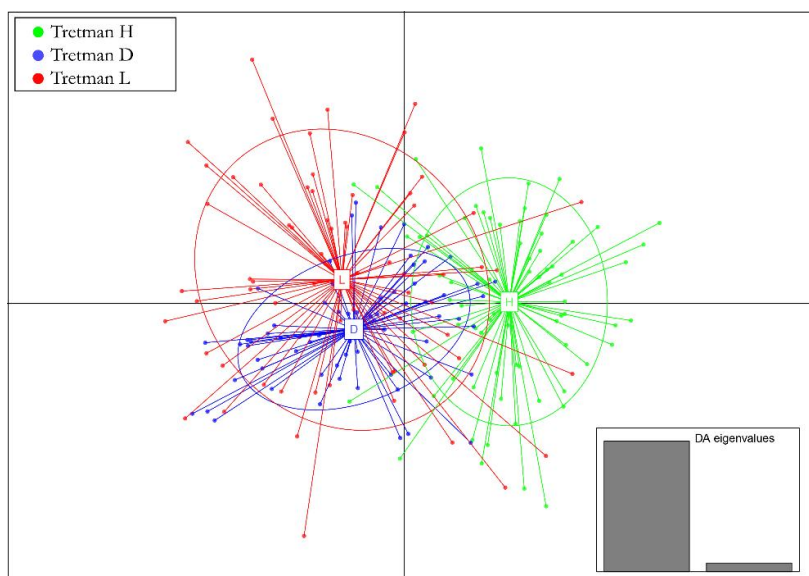
	Wilks value	F	df1	df2	<i>p</i>
GS 46: DG+ŠG+SP+DDPE+SZ+ZZ+T+DDS					
Dužina tela	0.6672	12.16	8	195.0	<0.001
Tretman	0.8418	2.19	16	390.0	0.0051

Jednofaktorske ANCOVA analize su pokazale da su metamorfi gajeni u tretmanima isušivanja (D i L) imali značajno kraći stilopodijalni i zeugopodijalni deo zadnjeg ekstremiteta u odnosu na metamorfe iz H tretmana, bez razlike u dužinama ovih elemenata između D i L tretmana. Ostale morfološke osobine (dužina i širina glave, stilopodijalni deo, distalni delo prednjih ekstremiteta, skočni deo i distalni deo stopala) nisu se razlikovale između tretmana (**Tabela 16.a**). Međutim, razlike u dužini stilopodijalnog i zeugopodijalnog dela zadnjeg ekstremiteta između tretmanima nisu izazvale promene u maksimalnom skoku postmetamorfni jedinki (**Tabela 16.b**)).

Tabela 16. Analiza kovarijanse (ANCOVA) za morfološke osobine u metamorfozi (GS 46) (a) i skakačke performanse (b) kod žutotrbog mukača. Dužina tela jedinki je korišćena kao kovarijabla. Statistički značajne razlike su istaknute podebljanim p vrednostima.

a) Morfološke osobine u metamorfozi (GS 46)	Tretman	F	<i>p</i>	Poređenje između tretmana	<i>post-hoc p</i>
Dužina glave	H	0.14	0.8694	H/D	/
	D			H/L	/
	L			D/L	/
Širina glave	H	2.54	0.0817	H/D	/
	D			H/L	/
	L			D/L	/
Stilopodijalni deo	H	0.24	0.7869	H/D	/
	D			H/L	/
	L			D/L	/
Distalni deo prednjih ekstremiteta	H	0.33	0.4277	H/D	/
	D			H/L	/
	L			D/L	/
Stilopodijalni deo zadnjeg ekstremiteta	H	67.38	<0.001	H/D	<0.001
	D			H/L	<0.001
	L			D/L	0.9269
Zeugopodijalni deo zadnjeg ekstremiteta	H	77.90	<0.001	H/D	<0.001
	D			H/L	<0.001
	L			D/L	0.8135
Skočni deo	H	2.32	0.1007	H/D	/
	D			H/L	/
	L			D/L	/
Distalni deo stopala	H	0.50	0.4653	H/D	/
	D			H/L	/
	L			D/L	/
b) Skakačke performanse					
Maksimalan skok	H	2.25	0.1111	H/D	/
	D			H/L	/
	L			D/L	/

Multivarijantna diskriminantna analiza glavnih komponenti (DAPC) koja je uključivala analizu svih morfoloških osobina (dužinu i širinu glave, dužine delova prednjih i zadnjih ekstremiteta), pokazala je jasno fenotipsko odvajanje između metamorfa gajenih u H tretmanu i tretmana isušivanja (D i L) duž prve LD ose (**Slika 21.**).



Slika 21. DAPC za morfološke osobine u metamorfozi (GS 46) žutostrbrog mukača (dužina glave, širina glave, stilopodijalni deo, distalni deo prednjih ekstremiteta, stilopodijalni deo zadnjih ekstremiteta, zeugopodijalni deo zadnjih ekstremiteta, skočni deo i distalni deo stopala).

LD1 je objasnila 91,9% ukupne morfološke varijabilnosti sa najvećim vrednostima za dužinu stilopodijalnog i zeugopodijalnog dela zadnjih ekstremiteta, dok je LD2 objasnila 6,2% ukupne varijabilnosti sa najvećim vrednostima za širinu glave (**Tabela 17.**). Metamorfi iz H tretmana razlikuju se od metamorfa iz D i L tretmana uglavnom zbog stilopodijalnog i zeugopodijalnog dela zadnjih ekstremiteta.

Tabela 17. Doprinosi morfoloških osobina u multivarijantnoj diskriminantnoj analizi glavnih komponenti (DAPC) u metamorfozi kod žutostrbrog mukača. Veće vrednosti označavaju veći uticaj na odgovarajuće linearne diskriminante (LD1 - LD2) (najveće vrednosti za relevantne LD su označene podebljano).

	LD1	LD2
Dužina glave	0.2406	0.0001
Širina glave	0.0223	0.7390
Stilopodijalni deo	0.0024	0.0028
Distalni deo prednjih ekstremiteta	0.0395	0.0955
Stilopodijalni deo zadnjeg ekstremiteta	0.3210	0.1395
Zeugopodijalni deo zadnjeg ekstremiteta	0.3642	0.0221
Skočni deo	0.0051	0.0001
Distalni deo stopala	0.0050	0.0009

4.2 Eksperiment II: Utvrđivanje najosetljivijeg perioda razvića na isušivanje staništa u razviću žutotrbug mukača

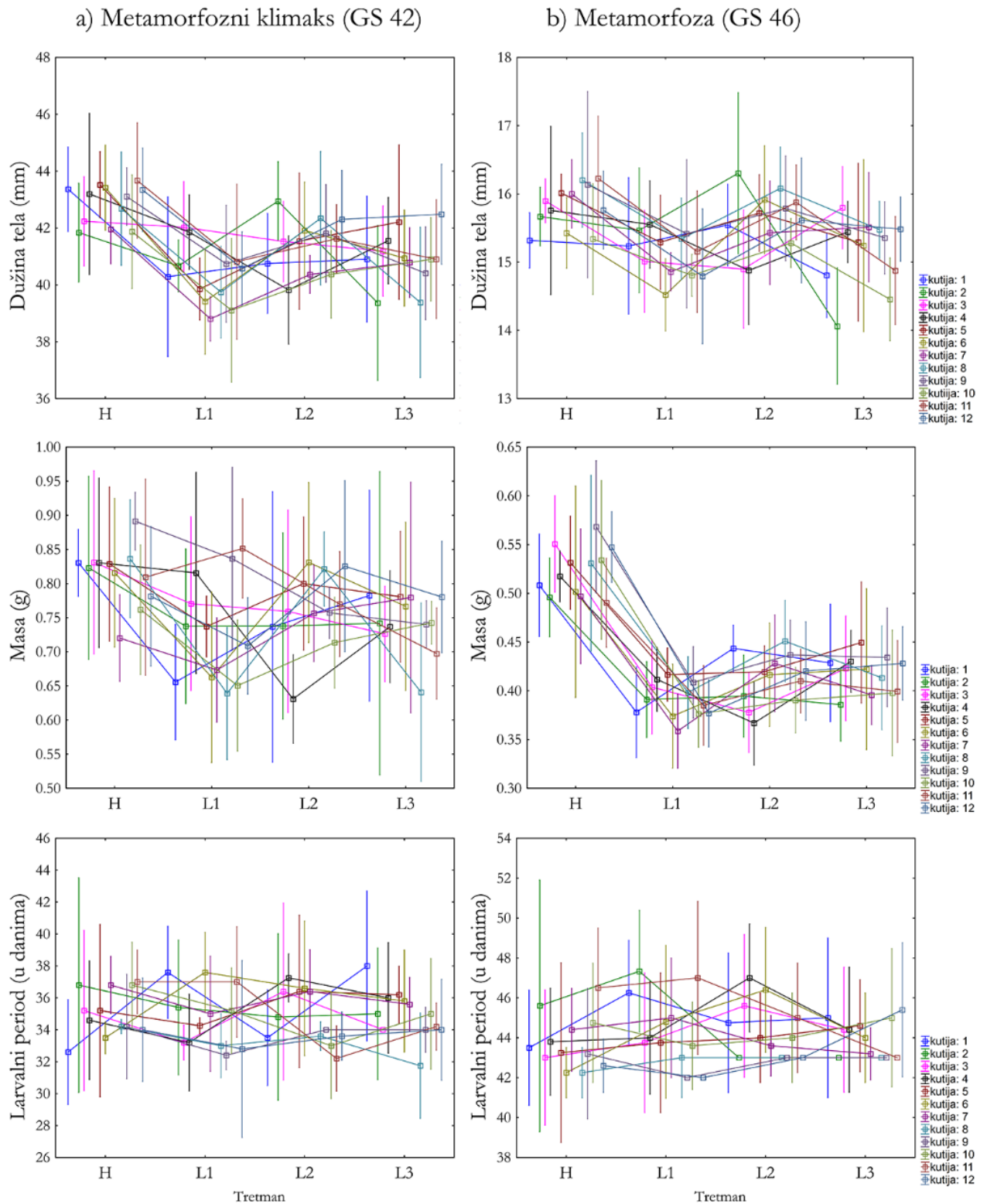
4.2.2 Osobine životne istorije

4.2.2.1 Osobine životne istorije pod konstantnim i sniženim vodenim uslovima u određenim fazama razvića, merene u metamorfoznom klimaksu (GS 42) i metamorfozi (GS 46)

Deskriptivna statistika osobina životne istorije na oba stadijuma je prikazana u **Tabeli 18.**, a **Slika 22.** prikazuje norme reakcije srednjih vrednosti po kutijama za dužinu tela, masu i larvalni period, posmatranih u četiri sredine, odnosno četiri tretmana (H, L1, L2, L3) u metamorfoznom klimaksu i metamorfozi.

Tabela 18. Deskriptivna statistika osobina životne istorije u metamorfoznom klimaksu (a) i metamorfozi (b) kod žutotrbug mukača. Jedinke su gajene u različitim vodenim uslovima: H - konstantno visok nivo vode; L1 - spušten nivo vode od GS 30-32; L2 - spušten nivo vode od GS 32-34; L3 - spušten nivo vode od GS 35-37. N - broj jedinki po tretmanu; SV - srednja vrednost; SD - standardna devijacija.

a) Metamorfozni klimaks (GS 42)					b) Metamorfoza (GS 46)		
	Tretman	N	SV	SD	N	SV	SD
Dužina tela (mm)	H	58	42.82	1.69	54	15.81	0.74
	L1	57	40.33	1.91	53	15.09	0.74
	L2	58	41.48	1.76	57	15.61	0.78
	L3	58	40.94	2.00	55	15.19	0.82
Masa (g)	H	58	0.81	0.10	54	0.52	0.06
	L1	57	0.72	0.11	53	0.38	0.03
	L2	58	0.76	0.10	57	0.41	0.04
	L3	58	0.74	0.11	55	0.41	0.05
Larvalni period (u danima)	H	58	35.06	3.63	54	43.75	3.17
	L1	57	34.71	3.31	53	44.22	2.95
	L2	58	34.79	3.45	57	44.33	2.41
	L3	58	35.01	3.01	55	43.98	2.29
Stopa rasta	H	58	23.52	4.28	54	12.05	1.84
	L1	57	21.13	3.88	53	8.85	1.18
	L2	58	22.25	4.27	57	9.35	1.14
	L3	58	21.34	3.30	55	9.53	1.22
Kondicioni indeks (BCI)	H	58	0.75	0.07	54	0.49	0.07
	L1	57	0.75	0.10	53	0.41	0.04
	L2	58	0.77	0.10	57	0.40	0.03
	L3	58	0.75	0.10	55	0.43	0.04



Slika 22. Prikaz normi reakcija srednjih vrednosti sa standardnim devijacijama (± 1 SD) po kutijama za dužinu tela, masu i larvalni period u metamorfoznom klimaksu (a) i metamorfozi (b) jedinki žutotrbog mukača odgajanih u različitim vodenim uslovima, odnosno u četiri različite sredine. H - konstantno visok nivo vode; L1 - spušten nivo vode od GS 30-32; L2 - spušten nivo vode od GS 32-34; L3 - spušten nivo vode od GS 35-37.

Izloženost jedinki sniženim vodenim uslovima u određenim fazama razvića je značajno uticala na dužinu tela, masu i stopu rasta jedinki u GS 42 i GS 46, dok je larvalni period ostao nepromenjen na oba stadijuma. Rezultati kondicionog indeksa su se razlikovali po stadijumima (**Tabela 19. i 20., Slika 23.**).

Najduže jedinke su bile jedinke iz H tretmana u odnosu na sve ostale L tretmane, dok su jedinke iz L1 tretmana bile najmanje na oba stadijuma (**Tabela 18.** pod a) i b)), ali se njihova dužina tela nije statistički značajno razlikovala u odnosu na jedinke iz L3 tretmana (**Tabela 19. i 20., Slika 23.**). Takođe se dužina tela jedinki iz L2 i L3 tretmana nije značajno razlikovala u GS 42 ali su te razlike bile značajne u GS 46. U GS 46 nije postojala značajna razlika u dužini tela između jedinki gajenih u H i L2 tretmanu (**Tabela 19. i 20., Slika 23.**).

Kada je masa jedinki u pitanju, najveću masu su imale jedinke poreklom iz H tretmana, dok su najmanju masu imale jedinke iz L1 tretmana (**Tabela 18.** a i b) koje su se značajno razlikovale od jedinki iz H tretmana na oba stadijuma. Mase jedinki poreklom iz H i L2 tretmana se nisu značajno razlikovale u GS 42, ali su razlike u masi između ova dva tretmana uočene u GS 46 (**Tabela 19. i 20., Slika 23.**). Poređenje masa između L tretmana u GS 42 je pokazalo da ne postoje značajne razlike u masi između tri L tretmana. Međutim, u GS 46 uočena je značajna razlika u masama jedinki između L1 i L2 tretmana, kao i između L1 i L3 tretmana, pri čemu jedinke iz L1 tretmana imaju najmanju masu u odnosu na jedinke iz L2 i L3 tretmana. Razlike u masama između jedinki poreklom iz L2 i L3 tretmana nisu uočene (**Tabela 19. i 20., Slika 23.**).

Larvalni period jedinki se nije značajno razlikovao između tretmana na oba stadijuma, odnosno sve jedinke su dostigle metamorfozni klimaks i metamorfozu približno u isto vreme (**Tabela 19. i 20., Slika 23.**).

Najveću stopu rasta su imale jedinke poreklom iz H tretmana, a najmanju jedinke iz L1 tretmana (**Tabela 18.** pod a i b). U GS 42 stopa rasta se nije značajno razlikovala između jedinki iz H i L2 tretmana dok je u odnosu na L1 i L3 tretman stopa rasta jedinki iz H tretmana bila značajno veća. Poređenje stopa rasta između svih L tretmana u GS 42 je pokazalo da ne postoje značajne razlike u stopama rasta između tri L tretmana, dok se u GS 46 stopa rasta jedinki iz L tretmana razlikovala samo između L1 i L3 tretmana, sa nižim vrednostima kod jedinki iz L1 tretmana. U GS 46 je stopa rasta jedinki poreklom iz H tretmana bila značajno veća u odnosu na sve L tretmane (**Tabela 19. i 20.**).

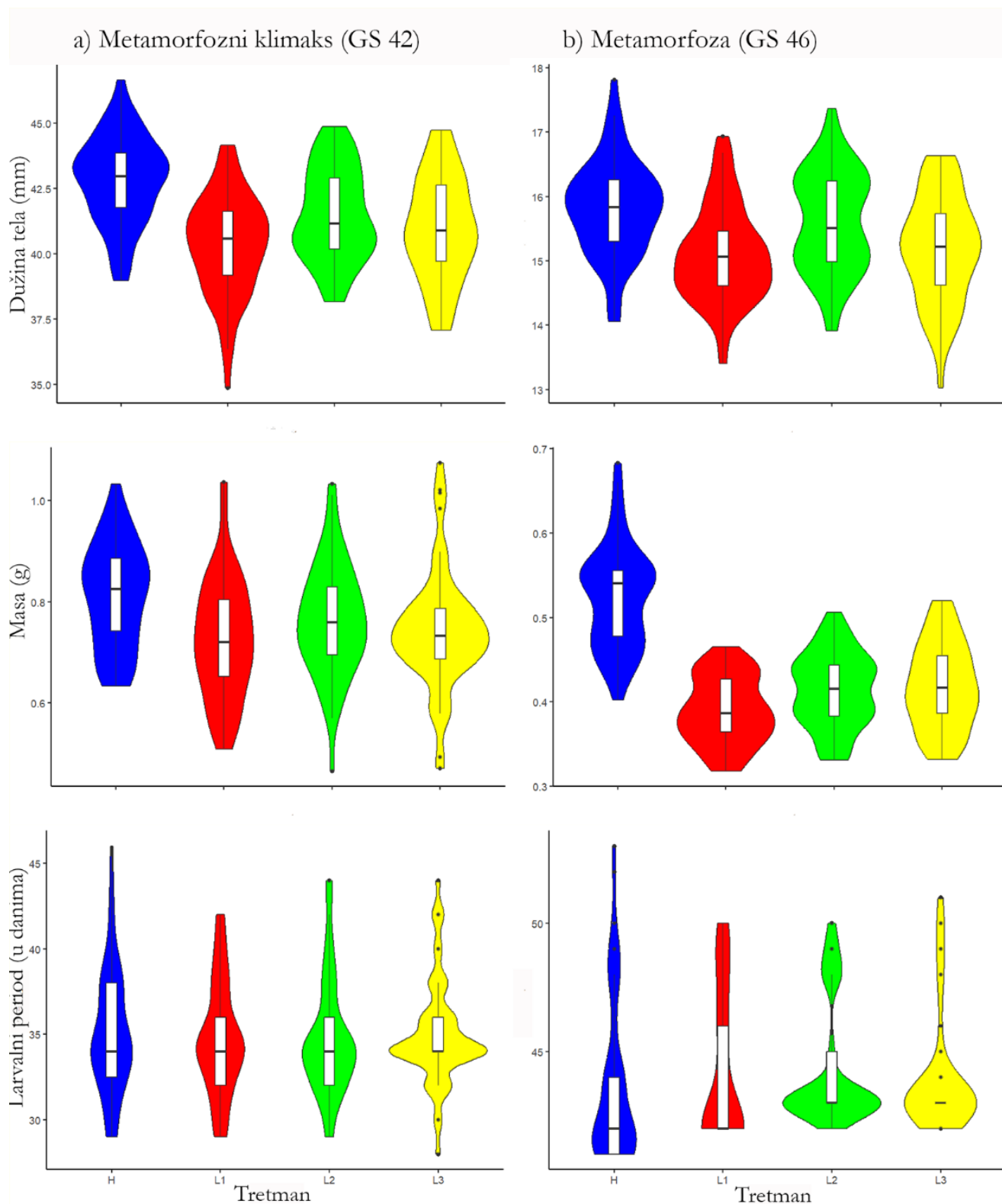
Kondicioni indeks (BCI) jedinki se nije značajno razlikovao između tretmana u GS 42, dok su jedinke iz H tretmana imale značajno veći BCI u GS 46 u odnosu na sve L tretmane (**Tabela 18.** a i b). Takođe je u GS 46 postojala razlika u BCI između L2 i L3 tretmana, dok razlike između ostalih L tretmana na ovom stadijumu nisu uočene (**Tabela 19. i 20.**).

Tabela 19. Efekat uslova isušivanja staništa u određenim fazama razvića na osobine životne istorije u metamorfoznom klimaksu (GS 42) žutotrbovog mukača. LMM - linearni mešoviti modeli gde je tretman fiksni faktor a kutija slučajni faktor. N - ukupan broj analiziranih jedinki, n - ukupan broj testiranih kutija. Tukijev post-hoc test sa Bonferoni korekcijom je korišćen za poređenja između tretmana (H, L1, L2, L3). H - konstantno visok nivo vode; L1 - spušten nivo vode od GS 30-32; L2 - spušten nivo vode od GS 32-34; L3 - spušten nivo vode od GS 35-37.

LMM						Tuki post-hoc test (poređenja između tretmana)						
Zavisna varijabla	Fiksni faktor (Tretman)	Estimate (SE)	t-vrednost	p	N(n)		H/L1	H/L2	H/L3	L1/L2	L1/L3	L2/L3
Dužina tela (mm)	Intercept	42.82 (0.25)	167.8	<0.001	231 (12)	Estimate (SE)	-2.49 (0.34)	-1.34 (0.33)	-1.88 (0.33)	1.14 (0.34)	0.60 (0.34)	-0.54 (0.33)
	L1	-2.49 (0.34)	-7.31			z-vrednost	-7.31	-3.96	-5.56	3.36	1.76	-1.6
	L2	-1.34 (0.33)	-3.96			p	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.004	0.289	0.373
	L3	-1.88 (0.33)	-5.56									
Masa tela (g)	Intercept	0.81 (0.01)	55.68	<0.001	231 (12)	Estimate (SE)	-0.08 (0.02)	-0.04 (0.02)	-0.06 (0.02)	0.03 (0.02)	0.01 (0.02)	-0.01 (0.02)
	L1	-0.08 (0.02)	-4.14			z-vrednost	-4.14	-2.37	-3.32	1.77	0.83	-0.94
	L2	-0.04 (0.02)	-2.37			p	< 0.001	0.082	0.005	0.285	0.839	0.779
	L3	-0.06 (0.02)	-3.32									
Larvalni period (u danima)	Intercept	35.07 (0.46)	75.48	0.927	231 (12)	Estimate (SE)	/	/	/	/	/	/
	L1	-0.36 (0.61)	-0.58			z-vrednost	/	/	/	/	/	/
	L2	-0.27 (0.61)	-0.44			p	/	/	/	/	/	/
	L3	-0.06 (0.61)	-0.1									
Stopa rasta	Intercept	0.35 (0.13)	2.7	<0.001	231 (12)	Estimate (SE)	-0.58 (0.18)	-0.31 (0.18)	-0.53 (0.18)	-0.27 (0.18)	-0.05 (0.18)	-0.22 (0.18)
	L1	-0.58 (0.18)	-3.25			z-vrednost	-3.25	-1.73	-2.98	1.52	0.28	-1.25
	L2	-0.31 (0.18)	-1.73			p	0.006	0.304	0.014	0.421	0.992	0.593
	L3	-0.53 (0.18)	-2.98									
Kondicioni indeks (SMI)	Intercept	0.75 (0.01)	58.83	0.788	231 (12)	Estimate (SE)	/	/	/	/	/	/
	L1	-0 (0.01)	-0.12			z-vrednost	/	/	/	/	/	/
	L2	0.01 (0.01)	0.67			p	/	/	/	/	/	/
	L3	-0 (0.01)	-0.25									

Tabela 20. Efekat isušujućih uslova staništa u određenim fazama razvića na osobine životne istorije u metamorfozi (GS 46) žutotrbovog mukača. LMM - linearni mešoviti modeli gde je tretman fiksni faktor a kutija slučajni faktor. N - ukupan broj analiziranih jedinki, n - ukupan broj testiranih kutija. Tukijev post-hoc test sa Bonferoni korekcijom je korišćen za poređenja između tretmana (H, L1, L2, L3). H - konstantno visok nivo vode; L1 - spušten nivo vode od GS 30-32; L2 - spušten nivo vode od GS 32-34; L3 - spušten nivo vode od GS 35-37.

LMM						Tuki post-hoc test (poređenje između tretmana)							
Zavisna varijabla	Fiksni faktor (Tretman)	Estimate (SE)	t-vrednost	p	N(n)		H/L1	H/L2	H/L3	L1/L2	L1/L3	L2/L3	
Dužina tela (mm)	Intercept	15.81 (0.10)	146.92	<0.001	219 (12)	Estimate	0.71	0.20	0.62	0.51	0.09	0.41	
						(SE)	(0.14)	(0.14)	(0.14)	(0.14)	(0.14)	(0.14)	(0.14)
	L1	0.71 (0.14)	-4.8			z-vrednost	-4.8	-1.41	-4.22	3.47	0.62	-2.86	
	L2	0.20 (0.14)	-1.4			p	< 0.001	0.492	< 0.001	0.0027	0.923	0.021	
	L3	0.62 (0.14)	-4.2										
Masa tela (g)	Intercept	0.52 (0.00)	73.39	<0.001	219 (12)	Estimate	0.13	0.11	0.10	0.02	0.02	0.00	
						(SE)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	
	L1	0.13 (0.00)	-14.33			z-vrednost	-14.32	-11.95	-11.32	2.62	3.12	0.53	
	L2	0.11 (0.00)	-11.95			p	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.043	0.009	0.95	
	L3	0.10 (0.00)	-11.32										
Larvalni period (u danima)	Intercept	43.76 (0.39)	112.05	0.67	219 (12)	Estimate	/	/	/	/	/	/	
						(SE)	/	/	/	/	/	/	
	L1	0.47 (0.52)	0.9			z-vrednost	/	/	/	/	/	/	
	L2	0,57 (0.51)	1.13			p	/	/	/	/	/	/	
	L3	0.21 (0.51)	0.42										
Stopa rasta	Intercept	1.14 (0.11)	10.1	<0.001	219 (12)	Estimate	1.74	1.46	1.37	0.27	0.37	0.09	
						(SE)	(0.14)	(0.13)	(0.13)	(0.13)	(0.13)	(0.13)	
	L1	1.74 (0.14)	-12.42			z-vrednost	-12.42	-10.65	-9.87	1.98	2.65	0.7	
	L2	1.46 (0.13)	-10.65			p	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.195	0.039	0.895	
	L3	1.37 (0.13)	-9.87										
Kondicioni indeks (SMI)	Intercept	0.49 (0.00)	65.85	<0.001	219 (12)	Estimate	0.08	0.09	0.05	0.01	0.02	0.03	
						(SE)	(0.01)	(0.01)	(0.01)	(0.01)	(0.01)	(0.01)	
	L1	0.08 (0.01)	-7.65			z-vrednost	-7.65	-8.96	-5.49	-1.15	2.22	3.43	
	L2	0.09 (0.01)	-8.96			p	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.625	0.115	0.003	
	L3	0.05 (0.01)	-5.49										



Slika 23. Grafički prikaz srednjih vrednosti osobina životne istorije (dužine tela, mase i larvalnog perioda) jedinki žutotrboog mukača prikazanih violin-plot graficima u (a) metamorfoznom klimaksu (GS 42) i (b) metamorfozi (GS 46). Jedinke su gajene u različitim vodenim uslovima: H - konstantno visok nivo vode (plava boja); L1 - spušten nivo vode od GS 30-32 (crvena boja); L2 - spušten nivo vode od GS 32-34 (zeleno boja); L3 - spušten nivo vode od GS 35-37 (žuta boja). Kutije i krajevi kutija prikazuju od 25. do 75. percentila a linije iznad i ispod od 10. do 90. percentila; crna linija unutar kutije označava medijanu; zvezdica označava ekstremne vrednosti.

4.2.2.2 Preživljavanje jedinki od početka eksperimenta (GS 25) do metamorfoze (GS 46)

Stopa preživljavanja u toku eksperimenta je bila relativno visoka. Na početku eksperimenta ukupan broj jedinki je iznosio 240, od čega je 8.75% jedinki (21 jedinka) uginulo do metamorfoze. Mortalitet je bio prisutan u svim tretmanima. U H tretmanu je uginulo 10% jedinki (6 od 60 jedinki), u L1 11.67% jedinki (7 od 60 jedinki), u L2 5% jedinki (3 od 60 jedinki) i u L3 tretmanu 8.33% jedinki (5 od 60 jedinki). Međutim, ove razlike u stopi preživljavanja između tretmana nisu bile statistički značajne ($\chi^2 = 1.943$; $p = 0.584$).

4.2.3 Morfološke osobine

4.2.3.1 Morfološke osobine jedinki pod konstantnim i sniženim vodenim uslovima u određenim fazama razvića, merene u metamorfoznom klimaksu (GS 42)

Deskriptivna statistika morfoloških osobina u metamorfoznom klimaksu data je u **Tabeli 21**.

Tabela 21. Deskriptivna statistika morfoloških osobina u metamorfoznom klimaksu (GS 42). Jedinke su gajene u različitim vodenim uslovima: H - konstantno visok nivo vode; L1 - spušten nivo vode od GS 30-32; L2 - spušten nivo vode od GS 32-34; L3 - spušten nivo vode od GS 35-37. SV - srednja vrednost; SD - standardna devijacija.

Morfološke osobine u GS 42	Tretman	SV	SD
Dužina trupa	H	15.68	0.45
	L1	14.89	0.66
	L2	15.12	0.57
	L3	15.08	0.55
		27.14	1.37
Dužina repa	H		
	L1	25.44	1.38
	L2	26.35	1.48
	L3	25.86	1.62

Rezultati MANCOVA analize za dužinu trupa i repa su pokazali da ni tretman ni kutija, kao ni njihova interakcija, nisu značajno uticali na zajedničku varijabilnost u GS 42 između ove dve morfološke osobine (**Tabela 22**).

Tabela 22. Rezultati multivarijantne analize kovarijanse (MANCOVA) za morfološke osobine u metamorfoznom klimaksu (GS 42) jedinki žutotrbug mukača gajenih u različitim vodenim uslovima. Statistički značajne razlike su istaknute podebljanim p vrednostima.

MANCOVA	Wilks value	F	df1	df2	<i>p</i>
GS 42: trup + rep					
Dužina tela	0.4101	194.16	1	135	<0.001
Tretman	0.9684	1.46	3	135	0.2268
Kutija	0.9373	0.82	11	135	0.6200
Tretman*Kutija	0.7404	1.43	33	135	0.0791

4.3 Eksperiment III: Uloga kortikosterona u variranju osobina životne istorije i morfologije žutotrbug mukača u uslovima isušivanja staništa

Rezultati ove teze vezani za utvrđivanje uloge kortikosterona u uslovima isušivanja staništa žutotrbug mukača su publikovani u radu Kijanović, A., Vukov, T., Mirč, M., Mitrović, A., Prokić, M.D., Petrović, T.G., Radovanović, T.B, Gavrilović, B.R., Despotović, S.G., Gavrić, J.P, & Tomašević Kolarov, N. (2024). The role of phenotypic plasticity and corticosterone in coping with pond drying conditions in yellow-bellied toad (*Bombina variegata*, Linnaeus 1758) tadpoles. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, **341(7)**, 753–765.

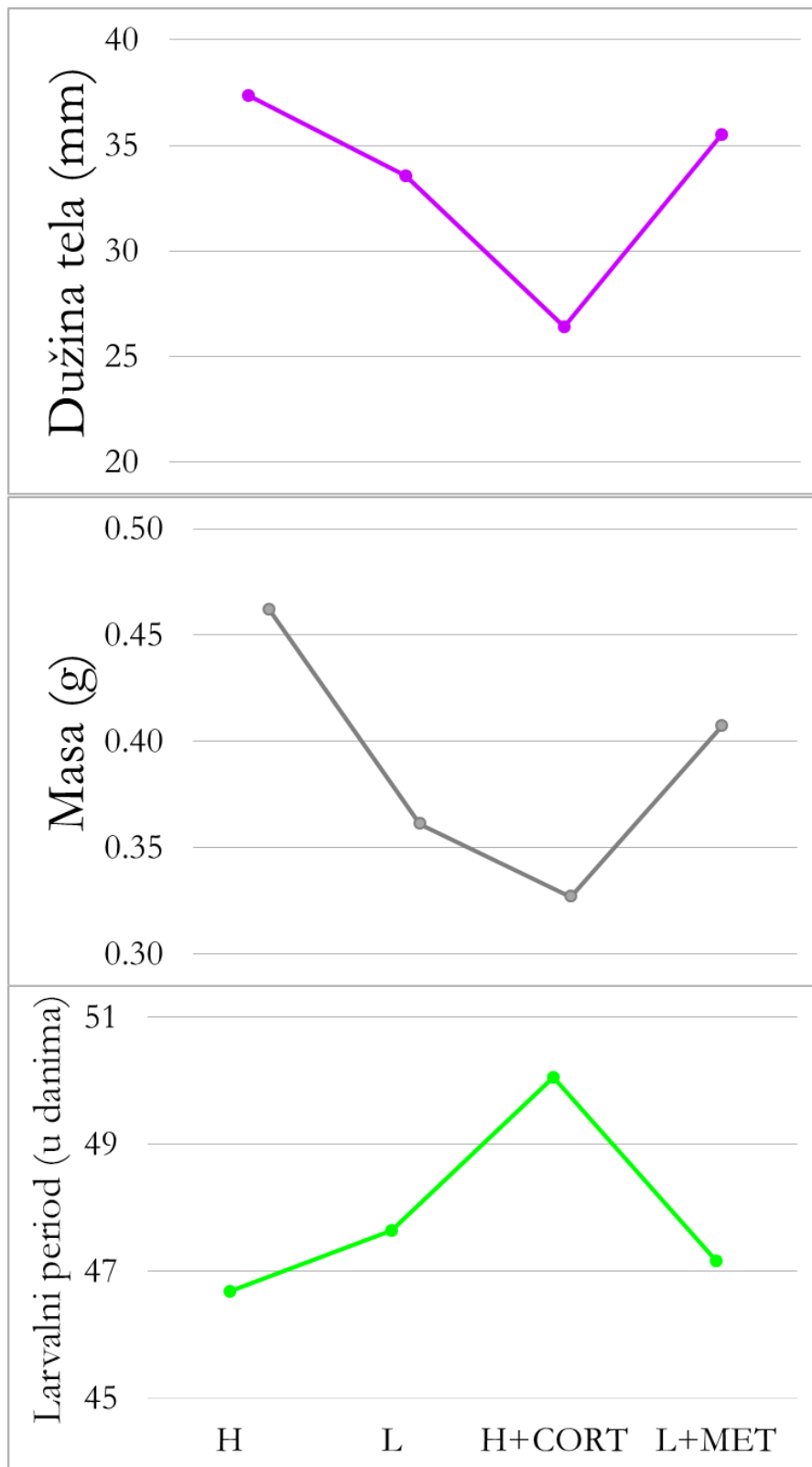
4.3.1 Osobine životne istorije

4.3.1.1 Osobine životne istorije pod uticajem različitih vodenih uslova i manipulacijom kortikosterona u metamorfoznom klimaksu (GS 42)

Deskriptivna statistika osobina životne istorije u metamorfoznom klimaksu (GS 42) je data u **Tabeli 23.** a **Slika 24.** prikazuje norme reakcije srednjih vrednosti dužine tela, mase i larvalnog perioda jedinki posmatranih u četiri sredine, odnosno četiri tretmana (H, L, H+CORT, L+MET) u metamorfoznom klimaksu (GS 42).

Tabela 23. Deskriptivna statistika osobina životne istorije u metamorfoznom klimaksu (GS 42). Jedinke potiču iz različitih vodenih uslova: H - konstantno visok nivo vode; L - konstantno nizak nivo vode; H+CORT - konstantno visok nivo vode sa egzogenim kortikosteronom; L+MET - konstantno nizak nivo vode sa metiraponom. N - broj jedinki po tretmanu; SV - srednja vrednost; SD - standardna devijacija.

Osobine životne istorije u metamorfoznom klimaksu (GS 42)				
	Tretman	N	SV	SD
Dužina tela (mm)	H	25	37.39	1.69
	L	23	33.54	2.39
	H+CORT	19	26.44	2.70
	L+MET	25	35.51	2.35
Masa (g)	H	25	0.46	0.04
	L	23	0.36	0.05
	H+CORT	19	0.33	0.03
	L+MET	25	0.41	0.04
Larvalni period (u danima)	H	25	24.68	3.83
	L	23	25.65	3.45
	H+CORT	19	28.05	4.85
	L+MET	25	25.16	3.29
Stopa rasta (masa/larvalni period)	H	25	9.97	1.28
	L	23	7.63	1.23
	H+CORT	19	6.60	0.99
	L+MET	25	8.70	1.27
Kondicioni indeks (SMI)	H	25	0.40	0.02
	L	23	0.40	0.03
	H+CORT	19	0.37	0.04
	L+MET	25	0.39	0.03



Slika 24. Prikaz normi reakcija po tretmanima srednjih vrednosti dužine tela, mase i larvalnog perioda u metamorfoznom klimaksu (GS 42) jedinki žutotrbož mukača odgajanih u različitim vodenim uslovima, odnosno u četiri različite sredine. H - konstantno visok nivo vode; L - konstantno nizak nivo vode; H+CORT - konstantno visok nivo vode sa egzogenim kortikosteronom; L+MET - konstantno nizak nivo vode sa metiraponom.

Rezultati MANOVA testa su pokazali da su različiti vodeni uslovi u kojima su jedinke gajene kao i variranje nivoa CORT-a, imali značajne uticaje na zajedničku varijabilnost između osobina životne istorije (dužinu tela, masu, larvalni period, stopu rasta i kondicioni indeks) (**Tabela 24.**).

Tabela 24. Rezultati multivarijantne analize varijanse (MANOVA) za osobine životne istorije žutotrbog mukača u metamorfoznom klimaksu (GS 42). Statistički značajna razlika je istaknuta podebljanom p vrednošću.

MANOVA	Wilks value	F	df1	df2	<i>p</i>
GS 42: dužina tela+masa+larvalni period+stopa rasta+kondicioni indeks					
Tretman	0.0944	20.92	15	232.28	<0.001

Različiti nivoi vode uz manipulaciju CORT-om značajno su uticali na dužinu tela i masu punoglavaca prilikom dostizanja metamorfoznog klimaksa (GS 42) (**Tabela 25., Slika 25.**). Jedinke gajene u L tretmanu su imale značajno manju dužinu i masu tela u poređenju sa jedinkama iz H tretmana (**Tabela 23.**). Jedinke iz H tretmana su bile najduže i najteže dok su jedinke iz H+CORT tretmana imale najkraće telo i najmanju masu. Međutim, vrednosti mase jedinki iz L i H+CORT tretmana se nisu značajno razlikovale (**Tabela 25.**). Srednje vrednosti dužine tela i mase jedinki iz L+MET tretmana su između vrednosti H i L tretmana (**Tabela 23.**) i ove razlike su statistički značajne za oba poređenja (H/L+MET i L/L+MET, **Tabela 25.**).

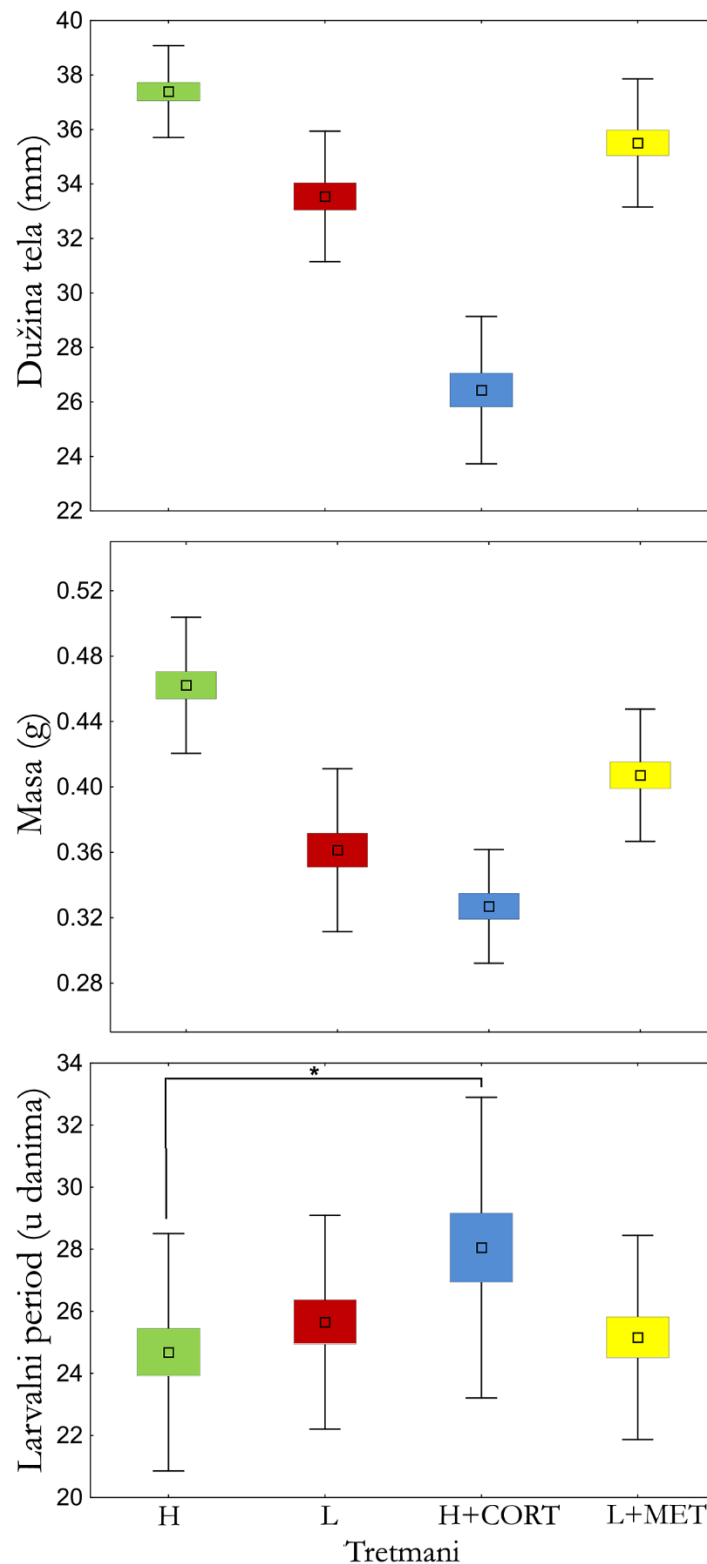
ANOVA analiza je pokazala da različiti nivoi vode uz manipulaciju CORT-om značajno utiču na larvalni period (**Tabela 25., Slika 25.**), pri čemu se larvalni period jedinki gajenih u L tretmanu nije razlikovao značajno od jedinki iz H, H+CORT i L+MET tretmana, tj. ove jedinke su dostigle metamorfozni klimaks u isto vreme. Kod jedinki na GS 42 iz H+CORT tretmana, larvalni period je bio produžen, ali se to značajno razlikovalo samo u poređenju sa H tretmanom.

Stopa rasta prilikom dostizanja GS 42 je bila značajno različita u svim tretmanima (**Tabela 25.**). Jedinke iz L tretmana su imale nižu stopu rasta u poređenju sa jedinkama iz H tretmana, koje su imale najveću vrednost stope rasta. Stopa rasta je bila najmanja kod jedinki iz H+CORT tretmana, a kod jedinki iz L+MET tretmana između vrednosti H i L tretmana.

BCI prilikom dostizanja GS 42 se nije razlikovao između jedinki iz H i L tretmana, i bio je najniži kod jedinki iz H+CORT tretmana. Međutim, to je bilo značajno samo u poređenju sa jedinkama iz H tretmana (**Tabela 25.**). Vrednosti BCI jedinki iz L+MET tretmana su se zanemarljivo razlikovale od vrednosti jedinki iz L tretmana (**Tabela 23.**), i te razlike nisu bile statistički značajne u poređenju ni sa jednim tretmanom.

Tabela 25. ANOVA test praćen Tukijevim post-hoc testovima za osobine životne istorije u metamorfoznom klimaksu žutotrbog mukača. H - konstantno visok nivo vode; L - konstantno nizak nivo vode; H+CORT - konstantno visok nivo vode sa egzogenim kortikosteronom; L+MET - konstantno nizak nivo vode sa metiraponom. Statistički značajne razlike su istaknute podebljanim p vrednostima.

Osobine životne istorije u metamorfoznom klimaksu (GS 42)					
	Tretman	F	<i>p</i>	Poređenje između tretmana	<i>post-hoc p</i>
Dužina tela (mm)	H	91.10	<0.001	H/L	<0.001
	L			H/H+CORT	<0.001
	H+CORT			H/L+MET	< 0.05
	L+MET			H+CORT/L+MET	<0.001
				L/H+CORT	<0.001
Masa (g)	H	42.96	<0.001	L/L+MET	< 0.05
	L			H/L	<0.001
	H+CORT			H/H+CORT	<0.001
	L+MET			H/L+MET	0.001
				H+CORT/L+MET	<0.001
Larvalni period (u danima)	H	3.13	0.029	L/H+CORT	0.066
	L			L/L+MET	<0.001
	H+CORT			H/L	0.826
	L+MET			H/H+CORT	0.040
				H/L+MET	0.971
Stopa rasta (masa/larvalni period)	H	31.54	<0.001	H+CORT/L+MET	0.100
	L			L/H+CORT	0.224
	H+CORT			L/L+MET	0.972
	L+MET			H/L	<0.001
				H/H+CORT	<0.001
Kondicioni indeks (SMI)	H	4.08	<0.01	H/L+MET	<0.01
	L			H+CORT/L+MET	<0.001
	H+CORT			L/H+CORT	0.049
	L+MET			L/L+MET	0.018
				H/L	0.826
	H/H+CORT	< 0.05			
	H/L+MET	0.971			
	H+CORT/L+MET	0.100			
	L/H+CORT	0.224			
	L/L+MET	0.972			



Slika 25. Osobine životne istorije (dužina tela, masa, larvalni period) žutotrbovog mukača u metamorfoznom klimaksu (GS 42). Jedinke su iz različitih vodenih uslova: H - konstantno visok nivo vode; L - konstantno nizak nivo vode; H+CORT - konstantno visok nivo vode sa egzogenim kortikosteronom; L+MET - konstantno nizak nivo vode sa metiraponom. Centralni kvadrati u box-plot graficima prikazuju srednje vrednosti; gornje i donje granice predstavljaju standardne devijacije. Zvezdica [*] označava značajnu razliku u larvalnom periodu između H i H+CORT tretmana. Detaljan prikaz rezultata sa svim statističkim značajnostima dat je u **Tabeli 25**.

4.3.1.2 Preživljavanje jedinki od početka eksperimenta (GS 35) do metamorfoznog klimaksa (GS 42)

Različiti vodeni uslovi sa manipulacijom CORT-a su uticali na preživljavanje jedinki. Eksperiment je započeo sa 104 punoglavca u GS 35, pri čemu je 11,54% jedinki uginulo pre GS 42. Najveća smrtnost je zabeležena u H+CORT tretmanu (7 od 26 jedinki; 26,92%), zatim u L tretmanu (3 od 26 jedinki; 11,53%), dok su H i L+MET tretmani imali isti procenat uginulih jedinki (1 od 26 jedinki; 3,84%). Ove razlike bile su statistički značajne samo kada se uporede H+CORT/H i H+CORT/L+MET tretmani (H+CORT/H i H+CORT/L+MET: $\chi^2 = 5,88$, $df = 1$, $p = 0,015$; za oba poređenja).

4.3.2 Fiziološke osobine

4.3.2.1 Uticaj različitih vodenih uslova i manipulacija kortikosteronom na nivo kortikosterona u prometamorfozi (GS 35) i metamorfoznom klimaksu (GS 42)

Deskriptivna statistika za nivoe kortikosterona u prometamorfozi (GS 35) i metamorfoznom klimaksu (GS 42) je data u **Tabeli 26**.

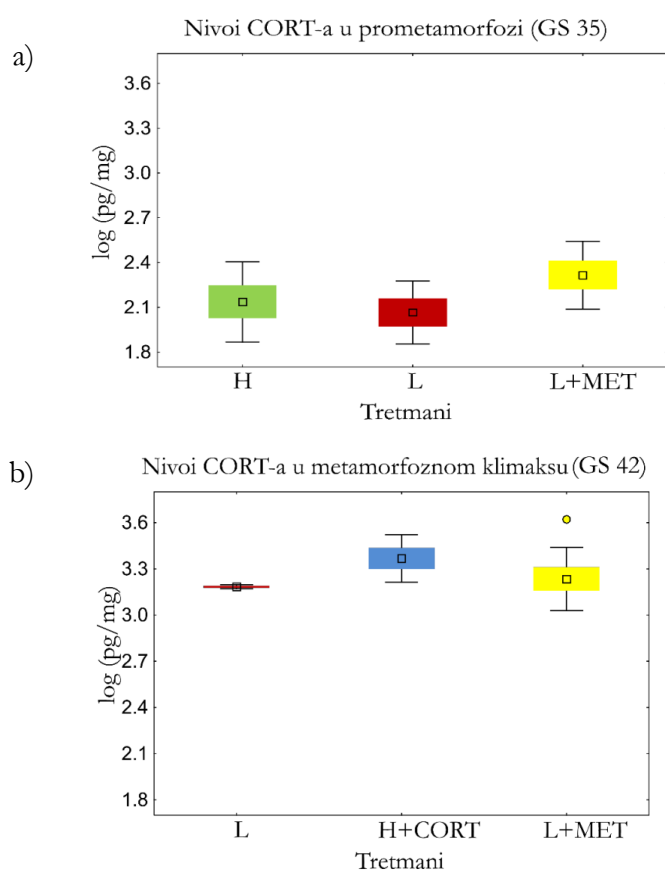
Tabela 26. Deskriptivna statistika za nivoe kortikosterona u prometamorfozi (a) i metamorfoznom klimaksu (b). Jedinke su iz različitih vodenih uslova: H - konstantno visok nivo vode; L - konstantno nizak nivo vode; H+CORT - konstantno visok nivo vode sa egzogenim kortikosteronom; L+MET - konstantno nizak nivo vode sa metiraponom. SV - srednja vrednost; SD - standardna devijacija.

a) CORT u prometamorfozi (GS 35)		
Tretman	SV	SD
H	2.13	0.26
L	2.06	0.20
L+MET	2.31	0.22
b) CORT u metamorfoznom klimaksu (GS 42)		
Tretman	SV	SD
L	3.18	0.01
H+CORT	3.37	0.15
L+MET	3.23	0.20

Rezultati ANOVA testa su pokazali da različiti nivoi vode uz manipulaciju CORT-om nisu imali značajan efekat na sadržaj CORT-a ni na jednom od stadijuma (GS 35 i GS 42) (**Tabela 27., Slika 26., a i b**). H+CORT tretman je isključen iz analize nivoa CORT-a u GS 35, a H tretman u GS 42, jer su izmereni nivoi CORT-a bili izvan RIA standardne krive. Nivoi CORT-a su ostali nepromenjeni i kod jedinki gajenih u konstantno niskim vodenim uslovima (L tretman) u GS 35, i vrednosti su bile uporedive sa vrednostima CORT-a jedinki iz H tretmana. Pošto se nivo CORT-a nije razlikovao između tretmana ni na jednom od dva stadijuma, stadijumu su objedinjeni i urađen je t test kako bi se uočile razlike u nivoima CORT-a između stadijuma. Ova analiza je pokazala da jedinke u metamorfoznom klimaksu (GS 42) imaju više nivoe CORT-a nego jedinke u prometamorfozi (GS 35) (t test: $p < 0.001$).

Tabela 27. Rezultati ANOVA testa za nivo CORT-a u prometamorfozi (a) i metamorfoznom klimaksu (b) žutotrbug mukača. SV - srednja vrednost; SD - standardna devijacija.

a) CORT u prometamorfozi (GS 35)		
Tretman	F	p
H		
L	1.63	0.2292
L+MET		
b) CORT u metamorfoznom klimaksu (GS 42)		
Tretman	F	p
L		
H+CORT	1.37	0.2903
L+MET		



Slika 26. Nivoi kortikosterona u prometamorfozi (GS 35) (a) i metamorfoznom klimaksu (GS 42) (b) žutotrbug mukača. Jedinke su iz različitih vodenih uslova: H - konstantno visok nivo vode; L - konstantno nizak nivo vode; H+CORT - konstantno visok nivo vode sa egzogenim kortikosteronom; L+MET - konstantno nizak nivo vode sa metiraponom. Centralni kvadrati u box-plot graficima prikazuju srednje vrednosti; gornje i donje granice predstavljaju standardne devijacije; krug predstavlja outlajere.

4.3.2.2 Uticaj različitih vodenih uslova i manipulacija kortikosteronom na parametre oksidacionog stresa u prometamorfozi (GS 35) i metamorfoznom klimaksu (GS 42)

Deskriptivna statistika parametara oksidacionog stresa u prometamorfozi (GS 35) i metamorfoznom klimaksu (GS 42) data je u **Tabeli 28**.

Tabela 28. Deskriptivna statistika parametara oksidacionog stresa u prometamorfozi (GS 35) (a) i metamorfoznom klimaksu (GS 42) (b). CAT - katalaza; GSH-Px - glutation peroksidaza; GSH - glutation; LPO - proces lipidne peroksidacije. Jedinke su iz različitih vodenih uslova: H - konstantno visok nivo vode; L - konstantno nizak nivo vode; H+CORT - konstantno visok nivo vode sa egzogenim kortikosteronom; L+MET - konstantno nizak nivo vode sa metiraponom. SV - srednja vrednost; SD - standardna devijacija.

		a) GS 35		b) GS 42	
		SV	SD	SV	SD
CAT	H	58.08	3.45	59.36	2.51
	L	59.42	4.25	53.16	2.89
	H+CORT	56.55	4.28	57.35	4.10
	L+MET	54.13	2.18	55.32	5.04
GSH-Px	H	1.99	0.33	3.17	0.43
	L	2.19	0.36	3.99	0.85
	H+CORT	2.26	0.46	3.92	0.87
	L+MET	1.93	0.38	4.56	1.28
GSH	H	58.75	22.47	255.32	93.92
	L	88.03	8.87	216.16	30.08
	H+CORT	136.24	26.86	197.74	67.60
	L+MET	80.30	41.79	229.45	49.74
LPO	H	4.59	1.38	3.48	1.16
	L	5.41	3.36	2.45	1.28
	H+CORT	9.73	3.79	3.52	0.91
	L+MET	4.41	0.99	3.46	1.82

Dvofaktorska MANOVA je pokazala da su različiti vodeni uslovi sa manipulacijom CORT-a i stadijum razvića (GS 35 i GS 42), kao i njihova interakcija (tretman*stadijum) imali značajan uticaj na zajedničku varijabilnost između parametara oksidacionog stresa (**Tabela 29**).

Tabela 29. Rezultati dvofaktorske multivarijantne analize varijanse (dvofaktorska MANOVA) za parametre oksidacionog stresa. Statistički značajne razlike su istaknute podebljanim p vrednostima.

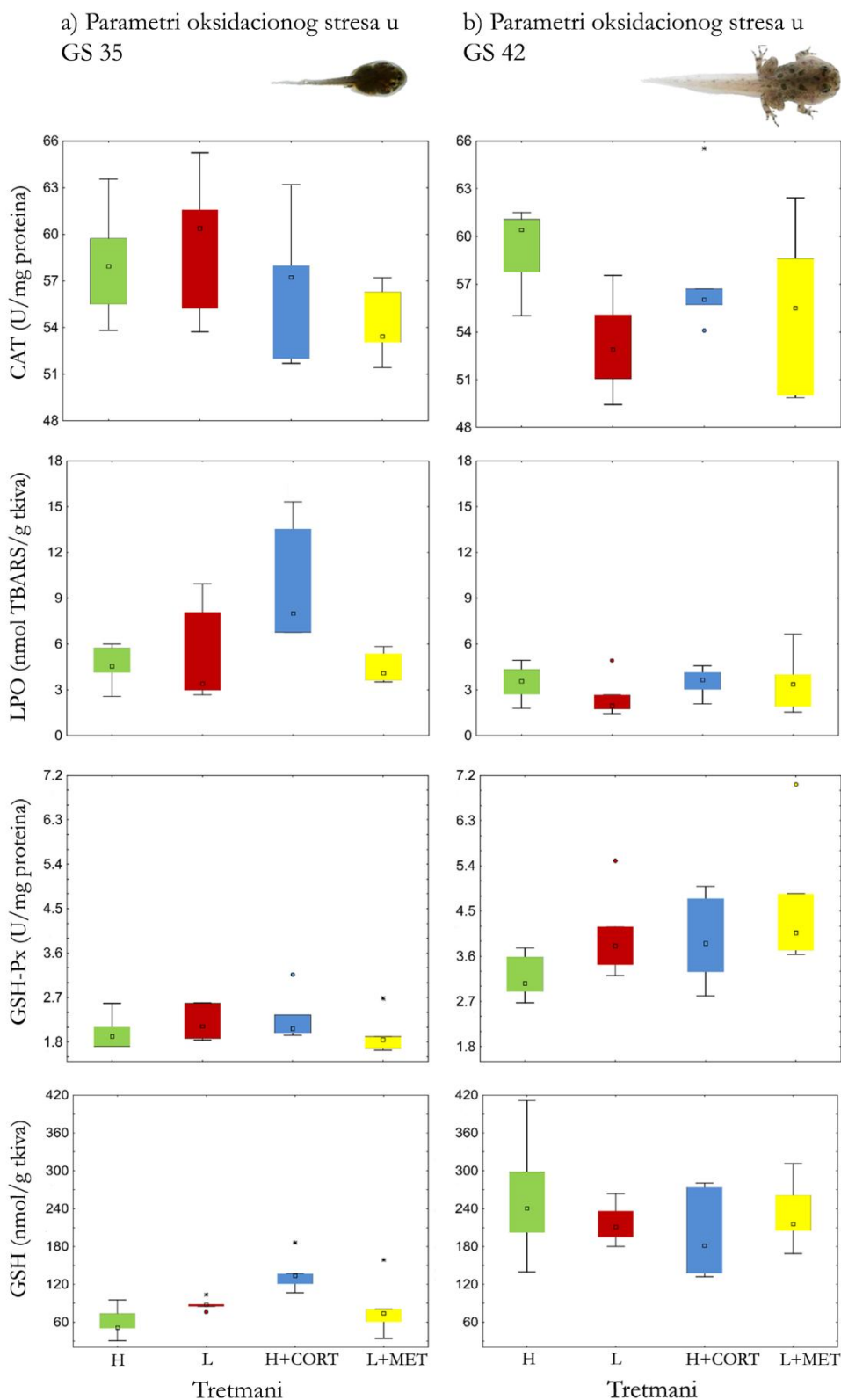
Dvofaktorska MANOVA	Wilks value	F	df1	df2	<i>p</i>
Parametri oksidacionog stresa					
Tretman	0.5116	2.23	12	92.9	0.016
stadijum	0.2116	32.59	4	35.0	<0.001
Tretman*stadijum	0.4043	3.16	12	92.9	<0.001

Dvofaktorska ANOVA je zatim pokazala da je tretman imao značajne efekte na lipidnu peroksidaciju (LPO), dok je stadijum razvića značajno uticao na glutation peroksidazu (GSH-Px), glutation (GSH) i LPO. Pored toga, značajne interakcije su pronađene za sve parametre oksidacionog stresa osim za GSH-Px (**Tabela 30.**, **Slika 27.**).

Tabela 30. Dvofaktorska ANOVA analiza za parametre oksidacionog stresa u prometamorfozi (GS 35) i metamorfoznom klimaksu (GS 42) žutotrbog mukača. Statistički značajne razlike su istaknute podebljanim p vrednostima. Rezultati Tukijevog post-hoc testa (gde je relevantno) su dati u tekstu.

Dvofaktorska ANOVA	SS	Stepeni slobode	MS	F	<i>p</i>
CAT					
Tretman	98.6	3	32.9	2.39	0.082
stadijum	6.7	1	6.7	0.49	0.487
Tretman*stadijum	122.2	3	40.7	2.96	< 0.05
GSH-Px					
Tretman	3.0331	3	1.0110	2.0747	0.118
stadijum	39.6740	1	39.6740	81.4133	<0.001
Tretman*stadijum	3.2419	3	1.0806	2.2175	0.100
GSH					
Tretman	1513	3	504	0.2036	0.893
stadijum	214938	1	214938	86.7471	<0.001
Tretman*stadijum	28306	3	9435	3.8080	< 0.05
LPO					
Tretman	62.5979	3	20.8660	4.7989	< 0.01
stadijum	90.3125	1	90.3125	20.7706	<0.001
Tretman*stadijum	52.9707	3	17.6569	4.0608	< 0.05

Tretman egzogenim CORT-om je doveo do viših nivoa LPO u poređenju sa svim drugim tretmanima u oba stadijuma (**Slika 27.**, $p < 0.01$ za sva poređenja). Poređenja tretmana između stadijuma pokazala su statistički značajno više nivoe GSH-Px i GSH u GS 42, osim za LPO (**Slika 27.**, $p < 0.01$ za sva poređenja).



Slika 27. Parametri oksidacionog stresa u prometamorfozi (GS 35) (a) i metamorfoznom klimaksu (GS 42) (b) žutotrskog mukača. Jedinke su iz različitih vodenih uslova: H - konstantno visok nivo vode; L - konstantno nizak nivo vode; H+CORT - konstantno visok nivo vode sa egzogenim kortikosteronom; L+MET - konstantno nizak nivo vode sa metiraponom. Centralni kvadrati u box-plot graficima prikazuju srednje vrednosti; gornje i donje granice predstavljaju standardne devijacije; krug predstavlja autlajere; zvezdica označava ekstremne vrednosti. CAT, katalaza; GSH, glutation; GSH-Px, glutation peroksidaza; LPO, proces lipidne peroksidacije.

4.3.3 Morfološke osobine

4.3.3.1 Morfološke osobine jedinki pod uticajem različitih vodenih uslova i manipulacijom kortikosterona u metamorfoznom klimaksu (GS 42)

Deskriptivna statistika morfoloških osobina u metamorfoznom klimaksu data je u **Tabeli 31**.

Tabela 31. Deskriptivna statistika morfoloških osobina u metamorfoznom klimaksu (GS 42). Jedinke su iz različitih vodenih uslova: H - konstantno visok nivo vode; L - konstantno nizak nivo vode; H+CORT - konstantno visok nivo vode sa egzogenim kortikosteronom; L+MET - konstantno nizak nivo vode sa metiraponom. SV -srednja vrednost; SD - standardna devijacija.

Morfološke osobine u GS 42	Tretman	SV	SD
Dužina trupa	H	13.50	0.49
	L	12.14	0.64
	H+CORT	12.02	0.57
	L+MET	12.92	0.63
Dužina repa	H	23.89	1.37
	L	21.41	1.83
	H+CORT	14.42	2.33
	L+MET	22.58	1.87

Rezultati MANCOVA analize su pokazali da su različiti vodeni uslovi i manipulacija kortikosteronom značajno uticali na zajedničku varijabilnost između dužina trupa i repa (**Tabela 32**).

Tabela 32. Rezultati multivarijantne analize kovarijanse (MANCOVA) za morfološke osobine (dužine trupa i repa) u metamorfoznom klimaksu (GS 42) žutotrbug mukača. Statistički značajne razlike su istaknute podebljanim p vrednostima.

MANCOVA	Wilks value	F	df1	df2	p
GS 42: dužina trupa+dužina repa					
Dužina tela	0.0000	15166104	2	86	<0.001
Tretman	0.4416	14	6	172	<0.001

ANCOVA analiza je pokazala da najduži trup imaju punoglavci u H tretmanu, dok su jedinke iz H+CORT i L tretmana imale najkraći trup, a trup jedinki iz L+MET tretmana je bio između vrednosti H i H+CORT/L tretmana (**Tabela 33**). Dužina repa bila je statistički različita u svim tretmanima, sa najdužim repovima kod jedinki iz H tretmana i najkraćim repovima kod jedinki gajenih u H+CORT tretmanu (**Tabela 33**., **Slika 28**).

a) Jedinka iz H tretmana



b) Jedinka iz H+CORT tretmana

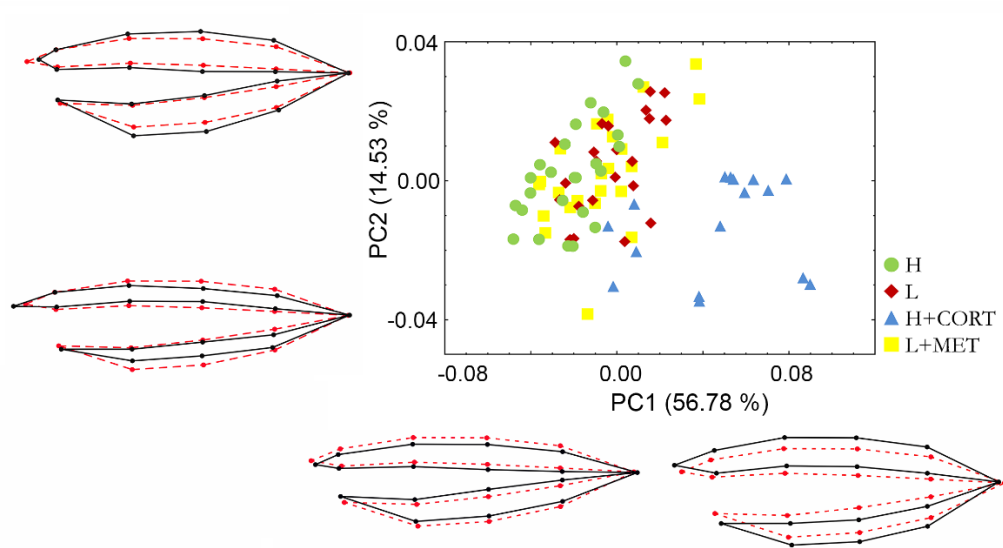


Slika 28. Jedinke žutotrbug mukača odgajane u (a) visokom nivou vode (H tretman) i (b) visokom nivou vode sa kortikosteronom (H+CORT tretman).

Tabela 33. Jednofaktorska analiza kovarijanse (ANCOVA) za morfološke osobine (dužina trupa i repa) u metamorfoznom klimaksu (GS 42) žutotrbug mukača. Statistički značajne razlike su istaknute podebljanim *p* vrednostima.

ANCOVA	Tretman	F	<i>p</i>	Poređenja između tretmana	<i>post-hoc p</i>
Dužina trupa	H	34.37	<0.001	H/L	<0.001
	L			H/H+CORT	<0.001
	H+CORT			H/L+MET	<0.001
	L+MET			H+CORT/L+MET	<0.001
				L/H+CORT	0.662
				L/L+MET	<0.001
Dužina repa	H	34.55	<0.001	H/L	<0.001
	L			H/H+CORT	<0.001
	H+CORT			H/L+MET	<0.001
	L+MET			H+CORT/L+MET	<0.001
				L/H+CORT	<0.001
				L/L+MET	<0.001

Analiza glavnih komponenti (PCA) je pokazala da postoje razlike u obliku repa među tretmanima. Prve dve ose glavnih komponenti opisale su 71,31% ukupne varijabilnosti u obliku repa i pokazale veliko preklapanje između H, L i L+MET tretmana, dok je H+CORT tretman bio jasno odvojen od svih drugih grupa po prvoj osi (MANOVA test na Prokrustovim koordinatama, $p < 0.001$) zbog najkraćih repova i najšireg mišićnog dela repa (**Slika 29**).



Slika 29. Analiza glavnih komponenti (PCA). Položaj metamorfa u morfoprostoru definisanim sa prve dve ose glavnih komponenti. Crvene isprekidane linije predstavljaju prosečan oblik repa; crne pune linije predstavljaju svaki oblik repa na ekstremnim vrednostima na PCA osi. Kod boja: zeleno - H tretman; crveno - L tretman; plavo - H+CORT tretman; žuto - L+MET tretman.

5. DISKUSIJA

Rezultati ove disertacije su pokazali da isušivanje staništa nije dovelo do ispoljavanja adaptivne fenotipske plastičnosti u brzini razvića kao što se očekivalo po Vilbur-Kolinsovom modelu. Jedinke žutotrbog mukača nisu ubrzale svoje razviće u isušujućim vodenim uslovima već je njihovo vreme do dostizanja metamorfoze bilo značajno duže (eksperiment br. 1) ili nepromenjeno (eksperimenti br. 2 i 3) u odnosu na jedinke gajene u konstantnim vodenim uslovima. Nepovoljni vodeni uslovi u kojima su jedinke odgajane su doveli do negativnih promena u drugim osobinama životne istorije kao i morfološkim osobinama jedinki. Jedinke iz isušujućih tretmana su imale manju dužinu tela i manju masu što se negativno odrazilo i na stopu rasta (u sva tri eksperimenta) i kondicioni indeks (eksperiment br. 1) na početku (GS 42) i na kraju metamorfoze (GS 46). Iako su isušujući uslovi negativno uticali na dužinu trupa jedinki, to se nije odrazilo na dužinu i oblik repa. Takođe, isušujući uslovi nisu uticali na skakačke performanse juvenilnih jedinki iako su ove jedinke imale kraći stilpodijalni i zeugopodijalni deo zadnjih ekstremiteta. Suprotno od očekivanog, u eksperimentu br. 3 konstantno niski vodeni uslovi nisu doveli do promena ni u nivou kortikosterona ni u antioksidacionom sistemu, dok su oksidaciona oštećenja bila povišena u prometamorfozi u tretmanu sa egzogeno dodatim CORT-om, ali ne i u GS 42. Nepromenjen ili produžen larvalni period u isušujućim vodenim uslovima, kao i nepromenjen nivo kortikosterona i parametara antioksidacionog sistema, sugerišu da je kod jedinki žutotrbog mukača iz populacije sa Fruške gore potencijalno došlo do modifikacija HPI ose. Ove promene su verovatno dovele do lokalne adaptacije brzine razvića na hidrološki režim Fruške gore putem genetičke asimilacije.

5.1 Uticaj isušivanja staništa na osobine životne istorije žutotrbog mukača

Performanse jedinki kao i njihov fitness su rezultat složenih interakcija između njihovog genotipa i sredine u kojoj se nalaze. Smatra se da jedinke sa visokim relativnim fitnessom imaju odgovarajući sklad između svog fenotipa i sredine. Fenotip, kao manifestacija genotipa oblikovana uticajem sredinskih faktora, može se dodatno prilagođavati trenutnim uslovima putem fenotipske plastičnosti, pri čemu organizmi menjaju svoj fenotip tokom razvića kao odgovor na signale iz sredine. Odavno je poznato da plastičnost može predstavljati adaptaciju koja omogućava jedinkama da prilagode svoj fenotip lokalnoj sredini, pod uslovom da su dostupni pouzdani signali koji ukazuju na uslove u toj sredini (npr. Stearns, 1989; West-Eberhard, 2003).

Rezultati sva tri eksperimenta su pokazali da ni jedinke uzgajane u postepeno isušujućem tretmanu kao ni one iz konstantno niskih vodenih uslova nisu ubrzale svoje razviće. Suprotno očekivanjima po Vilbur-Kolinsovom modelu, jedinke iz oba tretmana isušivanja su produžile svoje razviće ili je dužina larvalnog perioda ostala nepromenjena. Tretmani isušivanja su uticali i na druge osobine životne istorije prilikom metamorfoznog klimaksa i metamorfoze, kao što su dužina tela jedinki, masa, stopa rasta i kondicioni indeks, ali i na morfološke osobine jedinki na oba stadijuma (GS 42 i GS 46).

Modeli optimalnog vremena za metamorfozu (Wilbur i Collins, 1973; Werner, 1986) pretpostavljaju da su stopa rasta i dužina tela jedinki ključni faktori koji određuju proces metamorfoze. Jedinka mora dostići minimalnu dužinu tela kako bi otpočeo proces metamorfoze, odnosno, postoji donja granica dužine tela ispod koje metamorfoza nije moguća. Ova granica proističe iz morfoloških i fizioloških ograničenja, kao što su sposobnost hvatanja plena i veličina dostupnog plena, osetljivosti na isušivanje (zbog većeg odnosa površine i zapremine kod manjih jedinki) i osetljivosti na predatore (Denver, 2002). Jasno je da postoji značajna varijabilnost u donjoj granici dužine tela za metamorfozu kod vodozemaca

(Werner, 1986) kao i varijabilnost među vrstama u vremenu koje protekne od stadijuma izvaljivanja do prve pojave začetaka ekstremiteta (premetamorfoza), a zatim od pojave začetaka ekstremiteta do trenutka kada su zadnji ekstremiteti potpuno razvijeni (kasna prometamorfoza). Verovatno na obe faze deluje selekcija nezavisno. Tokom premetamorfoznog perioda, selekcija može najviše favorizovati brzinu rasta. Plastičnost u trajanju ove faze zavisi prvenstveno od dostupnih mogućnosti za rast, a punoglavci nemaju izbora osim da se prilagode uslovima u staništu i dostignu minimalnu dužinu tela potrebnu za metamorfozu. Tokom prometamorfoznog perioda, selekcija verovatno najviše deluje na endokrini sistem. U ovoj fazi, endokrini sistem punoglavca je dovoljno razvijen da mu omogući tranziciju iz akvatične sredine u terestričnu (Denver, 2002). Kada su uslovi u staništu povoljni za rast i razvoj jedinki, produkcija tiroidnih hormona ostaje niska, što omogućava nastavak rasta odnosno odlaganje metamorfoze kako bi se u larvalnoj fazi usvojilo što više resursa i kao rezultat toga jedinke imale veću dužinu tela u metamorfozi (Wilbur i Collins, 1973; Werner, 1986). Međutim, čak i ako se punoglavci drže u laboratoriji pod konstantno povoljnim uslovima, oni će na kraju ipak metamorfozirati—neće rasti neograničeno. Moguće je da postepeno povećanje aktivnosti tiroidne žlezde dostigne prag potreban da se inicira metamorfozni klimaks. Što su uslovi bolji, to je aktivnost tiroidne žlezde niža, ali na kraju dostiže nivo na kojem se pokreće pozitivna povratna sprega. Alternativno, aktivacija endokrinog sistema može biti posledica dostizanja gornje granice dužine tela (Denver, 2002). Kada se uslovi u staništu promene i imaju negativne efekte na rast jedinki, dolazi do kompromisa između rasta i razvića i aktivacije endokrinog sistema kako bi započeo proces metamorfoze koji omogućava prelazak iz vodenog u kopneno stanište. Odnosno, brzina razvića se ubrzava tokom stresnog perioda kao adaptivni odgovor na izmenjene uslove, omogućavajući jedinkama da napuste nepovoljne uslove, što rezultira smanjenim rastom i manjom dužinom tela u metamorfozi. To znači da jedinke ubrzavaju brzinu razvića po cenu smanjenja rasta. Na ovaj način se izbegava i smanjuje izloženost stresnim uslovima što povećava stopu preživljavanja i ostavljanje potomstva u budućnosti. Ovo je opšta strategija prilagođavanja razvojnih procesa vodozemaca u odgovoru na promene različitih abiotičkih i biotičkih sredinskih faktora kao što su temperaturne promene (npr. Walsh i sar., 2008; O'Regan i sar., 2014), isušivanje staništa (npr. Crump, 1989; Denver i sar., 1998; Lind i Johansson, 2007; Gómez Mestre i sar., 2013; Lent i Babbitt, 2020), promene u kvalitetu hrane (npr. Stoler i Relyea, 2013) i vode (npr. Katzenberger i sar., 2014), promene u intenzitetu kompeticije (npr. Relyea i Auld, 2004) i predatora (npr. Orizaola i sar., 2012).

Kao što je i očekivano u stresnim uslovima, u sva tri eksperimenta su jedinke iz dva isušujuća tretmana imale niže stope rasta, ali to nije izazvalo ubrzanje razvića kao što se očekuje u teoriji. Naprotiv, jedinkama iz oba isušujuća tretmana je larvalni period (tj. vreme do dostizanja metamorfoze) bio značajno duži ili nepromenjen u poređenju sa jedinkama iz tretmana sa konstantnim nivoom vode. Dobro je poznato da je plastičnost u stopi rasta univerzalna karakteristika životinja i da se pomoću nje jedinke brzo prilagođavaju ograničenjima koja se javljaju za vreme razvića (Dmitriew, 2011). Stopa rasta označava brzinu povećanja telesne mase ili dužine tela tokom razvića i ima ključnu ulogu u preživljavanju, reproduktivnom uspehu ali i interakciji sa abiotičkim i biotičkim faktorima. Rast zavisi od dostupnosti energije i resursa (nutrijenata), a fiziološka i ekološka ograničenja tokom razvića mogu usporiti ili ubrzati rast. Takva ograničenja često dovode do kompromisa u drugim osobinama životne istorije, zbog čega stabilizaciona selekcija favorizuje umerene stope rasta koje optimizuju balans između rasta i drugih osobina koje direktno utiču na fitnes jedinki (Dmitriew, 2011). Kod vodozemaca tokom razvića postoje različita ograničenja koja zavise od tipa staništa koje naseljavaju. Jedinke koje žive u stalnim vodama razvijaju se u stabilnim uslovima, gde je dostupnost vode konstantna i rizik od isušivanja nizak. Njihovo razviće može biti sporije i više usmereno ka optimizaciji rasta i postizanju većih dužina tela u metamorfozi. Nasuprot tome, jedinke koje se razvijaju u privremenim vodama, s periodičnim oscilacijama nivoa vode i koje su neprekidno pod rizikom od potpunog isušivanja, suočene su sa vremenskim ograničenjem. Njihov životni ciklus mora biti prilagođen nepredvidivim uslova i različite strategije mogu biti favorizovane kod vrsta koje ih naseljavaju kako bi fitnes jedinki u ovakvim uslovima bio maksimalan (Richter-Boix i sar., 2011). Richter-Boix i saradnici (2011) su uporedili plastičnost u stopama razvoja,

prosečnim stopama rasta i masi tela prilikom metamorfoze različitih vrsta žaba koje su podložne različitim rizicima od isušivanja staništa (visoki rizik naspram niskog rizika). Autori su jasno definisali staništa visokog i niskog rizika na osnovu trajnosti vodenih tela i učestalosti njihovog isušivanja. Staništa visokog rizika od isušivanja obuhvataju privremene bare koje zadržavaju vodu samo nekoliko nedelja ili meseci i redovno se isušuju svake godine, ponekad i više puta tokom jedne sezone. Staništa niskog rizika od isušivanja obuhvataju stalne bare koje zadržavaju vodu tokom cele godine u većini godina, s retkim slučajevima isušivanja. Dužina larvalnog perioda odražava karakteristike prvobitnog staništa vrste, uključujući njegovu trajnost i predvidljivost, dostupnost resursa i nivo kompeticije, temperaturne uslove, prisustvo predatora itd. Najvažnije je trajanje staništa, budući da razvoj i rast larvi vodozemaca zavise od vodenog okruženja (Denver, 2002). Vrste koje naseljavaju vode koje povremeno isušuju u uslovima stalno visokog nivoa vode rastu sporije nego jedinke iste vrste koje naseljavaju stalna vodena staništa. Povećani pritisci na preživljavanje larvi kod ovih vrsta dovode do maksimizacije razvića po cenu rasta, što sugerise da one primarno vrše alokaciju resursa ka razviću a ne rastu (Wilbur i Collins, 1973). Ova činjenica ukazuje na to da vrste koje naseljavaju privremena vodena staništa ne mogu dodatno povećati prosečnu stopu rasta u uslovima isušivanja, što je očekivano ako su prosečne stope rasta u uslovima stalno visokog nivoa vode blizu fiziološkog maksimuma (Richter-Boix i sar., 2011). I u našem eksperimentu su jedinke žutotrbovog mukača iz ispitane populacije verovatno dostigle maksimalne stope rasta u uslovima stalno visokog nivoa vode. To je onemogućilo dodatno povećanje stope rasta u isušujućim uslovima a kao rezultat toga ove jedinke imaju nižu stopu rasta a posledično i manju masu i dužinu tela u sva tri eksperimenta. Nemogućnost povećanja stope rasta kod jedinki iz stresnih uslova odlaže dostizanje minimalne dužine tela koja je neophodna za otpočinjanje metamorfoze (Day i Rowe, 2002) što je razlog zašto su jedinke iz isušujućih tretmana imale produženo razviće u eksperimentu br. 1 ili nepromenjeno u eksperimentima br. 2 i 3.

Različite vrste poput *Pseudacris regilla*, *Rana aurora* (Adams, 2000), *Pelophylax lessonae* (Semlitsch i Reyer, 1992), pokazuju slične obrasce promena osobina životne istorije pod rizikom od isušivanja kao i *Bombina variegata*. Takođe, produžen ili nepromenjen larvalni period je zabeležen kod različitih populacija žutotrbovog mukača poreklom iz Nemačke i Švajcarske (Böll, 2002; Sinsch i sar., 2020) čiji je larvalni period bio sličan kao kod jedinki iz prirodnih populacija sa Fruške gore (lična zapažanja). Sa druge strane, vrste *Melanophryniscus rubriventris* (Goldberg i sar., 2022), *Acris blanchardi* (Gordon i sar., 2016), *Lithobates catesbeianus* (Cook i sar., 2013), *Pseudacris maculata* (Amburgey i sar., 2012) takođe nisu ubrzale svoje razviće kao odgovor na isušivanje staništa, ali, za razliku od naših rezultata, kod ovih vrsta isušivanje staništa nije uticalo na dužinu tela i masu pri metamorfozi zahvaljujući mogućnosti da modifikuju svoje stope rasta, kako bi dostigli sličnu dužinu i masu tela u uslovima isušivanja staništa kao i u nepromenjenim vodenim uslovima.

Ključni resurs za rast punoglavaca je akumulacija masti tokom ranih larvalnih stadijuma, što je neophodno za pokretanje kasnijih faza u metamorfozi ali i za život u terestričnim uslovima (Bender i sar., 2018). Primarno masno tkivo kod punoglavaca su masna tela, koja imaju najviše lipida u odnosu na bilo koje drugo tkivo (Brown, 1964) i nalaze se ispred gonada (Duellman i Trueb, 1994). Masna tela počinju da se razvijaju nakon izvaljivanja i početka ishrane (Gramapurohit i sar., 1998). Lipidi se akumuliraju kako se punoglavci približavaju metamorfozi, a veličina masnih tela raste tokom metamorfoze, dostižući maksimum neposredno pre metamorfoznog klimaksa (Wright i sar., 2011). Količina masnog tkiva korelisana je sa dužinom telai kondicionim indeksom (Gramapurohit i sar., 1998), koji su ključni faktori za određivanje vremena početka i toka metamorfoze. Lipidi igraju ključnu ulogu u obezbeđivanju energije za metaboličke zahteve metamorfoze (Frieden i Naile, 1955).

U našim eksperimentima nemogućnost jedinki iz isušujućih tretmana da dostignu iste stope rasta kao jedinke iz tretmana sa konstantno visokim nivoom vode (iako su u svim tretmanima jedinke hranjene *ad libitum*), može biti povezana sa nedostatkom unutrašnjih resursa za rast i razvoj, što s druge strane ukazuje na fiziološku nemogućnost vrste za plastični odgovor (plastičnost osobina može se smanjiti ili

čak izgubiti ako su organizmi dovoljno dugo izloženi stabilnim uslovima). Kao rezultat pretpostavljenog nedostatka unutrašnjih resursa, jedinke iz oba isušujuća tretmana u svim eksperimentima imaju smanjene stope rasta. Istraživači su proučavali vrstu *Scaphiopus couchii*, koja ima najkraći larvalni period među bezrepiim vodozemcima i kanalisano razviće u isušujućim uslovima (tj. neporemenjen larvalni period) kod koje su dokazali odsustvo masnih tela, bez obzira na nivo vode u kojem su jedinke gajene (Kulkarni i sar., 2011, 2017). Srodne vrste *S. couchii* koje imaju sposobnost ubrzanja razvića u isušujućim uslovima staništa sadrže i masna tela u količini koja je korelisana sa njihovom plastičnošću u larvalnom periodu u ovim uslovima. Ova korelacija sugerise da su masna tela važna za omogućavanje fleksibilnosti u larvalnom periodu, verovatno pružajući energetske rezerve potrebne za prilagođavanje različitim ekološkim uslovima (Kulkarni i sar., 2011). U našim eksperimentima nismo ispitali sadržaj masnih tela kod žutotrbog mukača kako bi se izbeglo žrtvovanje jedinki, ali smo zabeležili niže vrednosti kondicionog indeksa u oba tretmana isušivanja u eksperimentu br. 1 na oba stadijuma. Kondicioni indeks između tretmana u eksperimentu br. 2 se razlikovao samo u GS 46 a u eksperimentu br. 3 nisu postojale razlike u ovoj osobini. Ovakvi rezultati mogu ukazivati na to da su najstresniji eksperimentalni uslovi bili u eksperimentu br. 1 te se to odrazilo na kondicioni indeks na oba stadijuma, iako su ostale osobine životne istorije imale isti odgovor u sva tri eksperimenta. Kondicioni indeks predstavlja meru telesne kondicije jedinke, najčešće izražen kao odnos mase i dužine tela, i često se koristi kao pokazatelj energetske rezerve organizma, odnosno njegove sposobnosti da se nosi sa stresom ili da uspešno završi razvojne faze. Kod larvi vodozemaca, posebno u uslovima stresa kao što je isušivanje kondicioni indeks može reflektovati kompromis između investiranja u ubrzanje razvića i održavanje osnovne fiziološke stabilnosti (Ruthsatz i sar., 2023a). Takođe, u kasnijim fazama razvića, loš kondicioni status može uticati i na uspešnost metamorfoze i početnu spremnost juvenilnih jedinki za kopneni način života. Niži kondicioni indeks povezan sa manjom masom i dužinom tela može biti posledica nedostatka masnih tela tokom metamorfoze (Zhu i sar., 2021) u svim isušujućim tretmanima u svim eksperimentima što može imati direktne posledice po preživljavanje, brzinu rasta i sposobnost jedinke da uđe u naredne faze razvića. Nedostatak masnih tela otežava dostizanje specifičnog razvojnog praga, koji predstavlja minimalnu dužinu tela ili stanje koje organizam u razvoju mora dostići kako bi se metamorfoza dogodila (Lind i Johansson, 2007), što rezultira produženjem larvalnog perioda jedinki u eksperimentu br. 1, ili nepromenjenim larvalnim periodom u eksperimentima br. 2 i 3 koji bi u prirodnim uslovima doveli do smrtnog ishoda jedinki usled nemogućnosti ubrzanja razvića.

5.1.1 Nepostojanje razvojnog prozora za ubrzanje razvića žutotrbog mukača u isušujućim uslovima

S obzirom na to da je prvi eksperiment pokazao da jedinke žutotrbog mukača ne ubrzavaju razviće u isušujućim uslovima, pitanje koje smo postavili je da li je rezultat koji je dobijen u prvom eksperimentu možda vezan za uski razvojni prozor za ubrzanje razvića pri isušivanju pa zato nismo mogli da uočimo promene u brzini razvića žutotrbog mukača. Shodno našim početnim hipotezama, simulirali smo isušujuće uslove u tri perioda prometamorfoze koji se jasno morfološki razlikuju: kada su vidljivi začeci zadnjih ekstremiteta (GS 30-32), kada začeci zadnjih ekstremiteta imaju oblik vesla (GS 32-34) i kada se na zadnjim ekstremitetima uočava razmak između prstiju (GS 35-37).

Razvojni prozor se definiše kao vremenski prozor tokom ontogeneze nekog organizma kada organizam može ispoljiti određeni fenotip kao odgovor na promene u sredini. Širok razvojni prozor podrazumeva da se neki fenotip može indukovati tokom dužeg ontogenetskog perioda. Međutim, ako organizmi nisu sposobni da odgovore na česte promene u sredini tokom svog ontogenetskog razvića (tj. imaju uske razvojne prozore), i ako postoje velika cena usled ispoljavanja suboptimalnog fenotipa, prirodna selekcija može delovati protiv favorizovanja prilagođavanja fenotipa ovim sredinskim

promenama. Nemogućnost reagovanja na promene u sredini tokom različitih ontogenetskih faza može nastati usled razvojnih ograničenja i neodgovarajućih senzornih sistema (Newman, 1992; Leips i Travis, 1994; Emerson, 2000; Hoverman i Relyea, 2007).

Iako je izloženost niskim vodenim uslovima u različitim fazama razvića dovela do smanjenja stope rasta kod svih L tretmana, to nije dovelo do ubrzanja razvića ni u jednom L tretmanu. Drugim rečima, odgovor jedinki na niske vodene uslove nije zavisio od Gosnerove faze u kojoj su jedinke izložene ovakvim uslovima. Sve jedinke su metamorfozirale u isto vreme kao i jedinke iz konstantno visokog nivoa vode. Ovakvi rezultati ne podržavaju Travisov model (Leips i Travis, 1994) dinamičke alokacije resursa, ali dodatno potvrđuju naše rezultate i hipoteze iz eksperimenta br. 1. Ispitana populacija žutotrbog mukača nema sposobnost ubrzanja razvića u isušujućim uslovima i ovaj izostanak plastičnog odgovora u larvalnom periodu ne zavisi od faze razvića u kojoj su jedinke izložene isušujućim uslovima. Jedinke žutotrbog mukača iz ispitane populacije imaju fiksni odgovor na isušujuće uslove. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima Böll (2002) koja je ispitala razvojni prozor za isušivanje žutotrbog mukača na Gosnerovim fazama GS 32, GS 36 i GS 39 izlagajući punoglavce poboljšanim ili pogoršanim vodenim uslovima na ovim stadijumima. Najmanju dužinu tela i masu su imale jedinke iz konstantno niskih vodenih uslova u GS 32, kao i u našem eksperimentu. Nemogućnost ubrzanja razvića i fiksnu razvojnu stopu koja je nezavisna od vodenih uslova u kojima su jedinke odgajane, autorka je objasnila mogućnošću postojanja genetičke kanalisnosti s obzirom na to da je postojala mogućnost da su jedinke poreklom iz istog paketića jaja. Genetička kanalisnost razvića podrazumeva stabilan fenotipski ishod uprkos varijacijama u sredinskim uslovima, što implicira da genetički mehanizmi amortizuju uticaje spoljašnje sredine i ograničavaju fenotipsku plastičnost. U ovom kontekstu, to znači da postoji nizak kapacitet za prilagođavanje razvića nepovoljnim hidrološkim uslovima. Takva razvojna stabilnost može biti rezultat selekcije tokom evolucije u predvidljivim sredinama, gde je fiksiran obrazac razvića bio adaptivan, ali istovremeno može predstavljati ograničenje u uslovima u kojima je ubrzano razviće neophodno za preživljavanje (West-Eberhard, 2003; Takahashi, 2019).

U prethodnim istraživanjima za ispitivanje Travisovog modela i postojanja razvojnog prozora tokom ontogenije vodozemaca korišćena je samo različita količina hrane kao faktor (Travis, 1984; Alford i Harris, 1988; Leips i Travis, 1994; Touchon i sar., 2015; Nilsson-Örtman i Rowe, 2021) osim našeg eksperimenta i eksperimenta Böll (2002) gde je faktor isušivanje staništa sa *ad libitum* količinom hrane. Prethodne studije su došle do sličnih zaključaka koji su u skladu sa Travisovim modelom: punoglavci koji su izloženi promenljivim količinama hrane tokom rane ili srednje faze ontogenije plastično odgovaraju promenama i u brzini razvića i u dužini tela. Male količine hrane kojima su jedinke izložene u ranim ontogenetskim fazama dovode do sporijeg razvića i manje dužine tela dok povećane količine hrane ubrzavaju razviće i pozitivno utiču na dužinu tela metamorfoziranih jedinki. Međutim, ako se punoglavcima smanji količina hrane u kasnijim fazama razvića, ovo smanjenje hrane više neće uticati na brzinu razvića nego samo na rast jedinki odnosno na dužinu tela u metamorfozi. Autori su zaključili da do fiksiranja dužine razvića dolazi u kasnijim ontogenetskim fazama. Međutim, do sada još ni jedan eksperiment nije precizno utvrdio u kojoj razvojnoj (Gosnerovoj) fazi dolazi do fiksacije brzine razvića. Audo i sar. (1995) su pokazali da se kod punoglavaca vrste *Hyla chrysoscelis* fiksacija razvića dogodila negde između stadijuma GS 33 i GS 38, dok je Hensley (1993) za *Pseudacris crucifer* utvrdio da se fiksacija dešava početkom prometamorfoze (GS 35-GS 37). Beachy i sar. (1999) su naveli da su punoglavci *Hyla versicolor* pri kasnoj promeni uslova već dostigli stadijum GS 34, kada je brzina razvića već bila fiksirana. Istraživanja pokazuju da, kada se količina hrane naglo smanji u prometamorfozi, punoglavci obično ubrzavaju razviće i metamorfoziraju ranije, iako napuštaju vodu s manjom masom. Nasuprot tome, ako se količina hrane smanji pre tog kritičnog stadijuma, odnosno u fazama premetamorfoze, razviće se zaustavlja i jedinke najčešće uginu. Ta prelomna tačka između različitih faza metamorfoze se javlja ranije kod vrsta koje žive u ekstremno sušnim staništima, jer su evolutivno prilagođene bržem završetku larvalnog perioda. Ipak, u nekim slučajevima – na primer pri vrlo jakom stresu ili kada je količina hrane

smanjena isuviše rano tokom razvića – ubrzanje izostane, što je praćeno i manjim rastom. Ukratko, intenzitet i faza ontogenetskog razvića kada je uveden nutritivni stres presudno određuju da li će punoglavac ubrzati metamorfozu ili će potpuno zaustaviti svoje razviće (D'Angelo i sar., 1941; Denver i sar., 1998; Morey i Reznick, 2000; Spieler, 2000, 2003).

Fiksna razvojna stopa otporna na isušujuće vodene uslove potvrđuje izostanak adaptivne fenotipske plastičnosti u larvalnom periodu žutotrbog mukača. Organizmi sa fiksnom razvojnom stopom razvijaju određeni fenotip i prolaze kroz razvojne faze istim tempom, bez obzira na promene u sredinskim uslovima što je odraz niskog stepena fenotipske plastičnosti. Iako niski vodeni uslovi nisu uticali na larvalni period, imali su negativan efekat na ključne osobine životne istorije jedinki iz svih L tretmana, odnosno doveli su do neadaptivnih plastičnih promena što se ogleda u manjoj dužini tela, masi i stopi rasta. Neadaptivne plastične promene se najčešće viđaju u sredinama koje predstavljaju nov selekциони pritisak za datu populaciju i gde selekcija nije oblikovala genetičku varijabilnost za plastičnost (Ghalambor i sar., 2007). Kao rezultat ispoljavanja neadaptivnih fenotipova može doći do lokalnog izumiranja ili do lokalne adaptacije ukoliko direkciona selekcija deluje na postojeću ili skrivenu genetičku i fenotipsku varijabilnost (Albecker i McCoy, 2019). S obzirom na to da je populacija žutotrbog mukača sa Fruške gore izolovana na ovom lokalitetu, moguće je da je došlo do lokalne adaptacije i kanalisanja brzine razvića u stresnim vodenim uslovima putem genetičke asimilacije. Fleksibilne razvojne stope su metabolički skupe i energetski zahtevne jer brzina razvića može da se prilagođava spoljašnjim uslovima usled visokog stepena fenotipske plastičnosti. Ovo bi, sa druge strane, ograničavalo organizme koji su konstantno izloženi stresnim vodenim uslovima na ispoljavanje adaptivnog plastičnog odgovora. Međutim, zbog sve ekstremnijih klimatskih promena poput visokih temperatura i suše, ova nemogućnost ubrzanja razvića žutotrbog mukača na Fruškoj gori može dovesti do velike smrtnosti jaja i larvi a vremenom i do izumiranja cele ove populacije.

5.2 Uticaj isušivanja staništa na morfološke osobine punoglavaca i prenosni efekti (*carry-over effects*) na juvenilne jedinke žutotrbog mukača

Ekološki faktori igraju značajnu ulogu u oblikovanju morfološke raznovrsnosti punoglavaca (Sherratt i sar., 2017), ali se smatra da je osnovni oblik tela kod različitih vrsta žaba prvenstveno pod genetskom kontrolom i da se uspostavlja u ranoj fazi razvića (Strauss i Altig, 1992). Morfološke osobine punoglavaca su povezane sa fitnessom jedinki tokom larvalnih faza (Pujol-Buxó i sar., 2017) i mogu imati dugoročne efekte na morfologiju i fitness juvenilnih jedinki (Tejedo i sar., 2010; Johansson i Richter-Boix, 2013). Među spoljašnjim faktorima koji najviše oblikuju populacije punoglavaca izdvajaju se prisustvo predatora i tip vodenog staništa, bilo da je ono efemerno ili permanentno (Pujol-Buxó i sar., 2017).

Prethodne studije su pokazale da isušujući vodeni uslovi dovode do izmenjene morfologije repnog peraja punoglavaca što može uticati na njihove plivačke sposobnosti. Punoglavci iz isušujućih vodenih uslova imaju uža i kraća repna peraja u odnosu na jedinke gajene u konstantnim vodenim uslovima što može ukazivati na adaptaciju za efikasnije plivanje u plitkim vodama ili ubranu resorpciju tokom metamorfoze (Richter-Boix i sar. 2006a, 2006b; Van Buskirk, 2009; Gómez i Kehr, 2019). Iako takva morfologija generalno smanjuje potisak i efikasnost kretanja kroz vodu, ona može predstavljati adaptaciju na specifične uslove plitkih, nestabilnih staništa (Van Buskirk, 2009). Smatra se da morfologija repnog peraja zavisi od dela vodenog stuba u kojem se punoglavci kreću. S obzirom na to da punoglavci koji naseljavaju stalne vode provode više vremena na različitim dubinama, njihovo repno peraje im pomaže da zadrže stabilnost prednjeg dela tela. S druge strane, u vodama koje često isušuju i gde je kretanje

ograničeno, manji otpor koji pruža uže repno peraje može omogućiti brže, nagle pokrete pri izbegavanju predatora (Van Buskirk, 2009). Osim toga, kraće repno peraje sadrži manje tkiva koje mora biti resorbovano tokom metamorfoze, što može doprineti skraćanju trajanja ove razvojne faze u uslovima kada je brzina prelaska u kopnenu fazu ključna za preživljavanje. Međutim, u studiji Johansson i sar. (2010) punoglavci koji su ubrzali razviće u isušujućim uslovima su imali takođe uže repno peraje i manju visinu trupa ali im je to omogućilo da imaju bolje plivačke performanse, uključujući veću brzinu i ubrzanje u poređenju sa punoglavcima odgajanim u konstantnim vodenim uslovima. Iako su isušujući uslovi uticali negativno na dužinu tela ovih punoglavaca, njihova sposobnost plivanja bila je poboljšana, što sugerise da određene morfološke adaptacije mogu kompenzovati smanjenu dužinu tela u stresnim uslovima (Johansson i sar., 2010).

Isušujući vodeni uslovi u eksperimentima br. 1 i 2 nisu uticali na morfologiju repa jedinki, dok su u eksperimentu br. 3 jedinke iz isušujućeg tretmana imale kraći rep. Odsustvo specifične morfologije repa može biti posledica drugih faktora. Različiti vodeni uslovi takođe nisu uticali na oblik repa kod punoglavaca vrste *Odontophrynus americanus*, a Boelter i sar. (2020) su zaključili da drugi faktori, poput pokrivenosti bare različitom vegetacijom, sastava akvatičnih predatora i dubine vode, mogu objasniti odsustvo promene oblika repa u različitim vodenim uslovima. Iako različiti vodeni uslovi nisu doveli do promena u obliku i dužini repa punoglavaca u eksperimentima br. 1 i 2, punoglavci odgajani u isušujućim vodenim uslovima su imali kraći rep i trup u eksperimentu br. 3. Skraćena dužina trupa i repa može biti posledica negativnog uticaja isušivanja na telesnu masu i stopu rasta. U drugim studijama, hronična izloženost hemijskim signalima predatora dovodi do relativno kraćeg trupa (Benard, 2004), ali naši rezultati pokazuju sličan obrazac u uslovima hroničnog isušivanja kod žutotrbug mukača.

Nekada se smatralo da su larvalna i juvenilna faza vodozemaca nezavisne i da uslovi koji vladaju u larvalnoj (akvatičnoj) fazi ni na koji način ne utiču na osobine životne istorije i/ili morfološke osobine u juvenilnoj (terestričnoj) fazi (Moran, 1994). Naši rezultati pokazuju da sredina u kojoj su punoglavci odgajani tokom larvalnog perioda utiče na osobine životne istorije, a te promene imaju dugoročne efekte na morfologiju juvenilnih jedinki. Iako je metamorfoza kod vodozemaca proces koji uključuje drastične fiziološke, biohemijske i morfološke transformacije, larvalne i juvenilne/adultne osobine nisu potpuno nezavisne u evolutivnom smislu (Richter-Boix i sar., 2006a). Mnoge studije su potvrdile da je dužina tela u metamorfozi osobina životne istorije koja je direktno povezana sa fitnesom nakon prelaska jedinki u terestrične uslove (npr. Sinsch i sar., 2020), jer jedinke sa manjom dužinom tela kasnije dostižu polnu zrelost i imaju manji reproduktivni potencijal u poređenju sa jedinkama koje su veće u metamorfozi (npr. Semlitsch i sar., 1988). Dugoročni efekti povezani sa isušivanjem staništa pokazuju da isušivanje negativno utiče na dužinu tela, masu i stopu rasta metamorfa, što dovodi do promenjene morfologije. U našem eksperimentu od svih ispitanih delova prednjih i zadnjih ekstremiteta, jedino su se stilopodijalni i zeugopodijalni deo zadnjeg ekstremiteta razlikovali kod jedinki iz isušujućih tretmana u odnosu na jedinke odgajane u konstantno visokom nivou vode, nezavisno od dužine tela. Metamorfi iz tretmana isušivanja su imali kraći stilopodijalni i zeugopodijalni deo zadnjeg ekstremiteta. Ovakvi rezultati su prisutni u eksperimentima isušivanja gde su vrste imale sposobnost da ubrzaju svoje razviće kao odgovor na isušujuće uslove (npr. Charbonnier i Vonesh, 2015; Enriquez-Urzelai i sar., 2013; Johansson i sar., 2016; Johansson i Richter-Boix, 2013; Márquez-García i sar., 2009; Richter-Boix i sar., 2006a). Naši rezultati i podaci iz literature ukazuju da je skraćivanje ekstremiteta očekivano u uslovima isušivanja, bez obzira na sposobnost vrste da ubrza razviće. Sličan obrazac variranja ekstremiteta pod uticajem isušivanja pronađen je kod *Agalychnis moreletii* (Hernández-Herrera i sar., 2019), vrste sa produženim razvićem koja ne pokazuje povećanu stopu rasta niti skraćivanje larvalnog perioda. Generalno, literatura o uticaju isušivanja na morfologiju kod vrsta koje ne ubrzavaju razviće nije brojna. Promene u dužinama stilopodijalnog i zeugopodijalnog dela zadnjih ekstremiteta nisu bile dovoljne da izazovu merljive posledice na skakačke sposobnosti žutotrbug mukača. Drugim rečima, varijabilnost u dužini ekstremiteta se ne odražava na varijabilnost u skakačkim sposobnostima, što je u skladu sa drugim studijama (npr. Sinsch i sar., 2020;

Székely i sar., 2020; Tejedo i sar., 2000; Van Buskirk i Saxer, 2001). Skakačke sposobnosti su direktno povezane sa individualnim fitnessom, jer omogućavaju izbegavanje predatora (Ward-Fear i sar., 2010), hvatanje plena (Walton, 1988) i disperziju (Phillips i sar., 2006). Istraživanja su pokazala da različiti faktori poput predatora, temperature i ishrane u larvalnom periodu imaju prenosne efekte na postmetamorfne performanse juvenilnih jedinki, ali rezultati nisu uvek dosledni među vrstama (Tejedo i sar., 2010). Na primer, punoglavci odgajani u prisustvu predatora ili na različitim temperaturama razvijaju duže ili kraće zadnje ekstremitete kada metamorfoziraju (Blouin i Brown, 2000; Van Buskirk i Saxer, 2001; Nicieza i sar., 2006; Gómez Mestre i sar., 2010). Međutim, plastičnost u dužini ekstremiteta nakon metamorfoze nije uvek povezana sa promenama u performansama kretanja kod nekih vrsta (Relyea, 2001; Van Buskirk i Saxer, 2001; Nicieza i sar., 2006) dok kod drugih negativno utiče na skakačke performanse juvenilnih jedinki (Beck i Congdon, 2000; Alvarez i Nicieza, 2002; Relyea i Hoverman, 2003; Gómez Mestre i sar., 2010).

Dužina tela u metamorfozi je ključna osobina životne istorije koja odražava dugoročne efekte pri prelasku iz larvalne u juvenilnu fazu jedinki i ima značajan uticaj na preživljavanje. Iako podaci iz literature ukazuju na jasnu vezu između manje dužine tela i niže stope preživljavanja juvenilnih jedinki, slabijeg imuniteta, smanjene otpornosti na parazite, niže tolerancije na dehidraciju, slabijih lokomotornih sposobnosti, većeg rizika od predacije i nižeg reproduktivnog uspeha (Amburgey i sar., 2012; Gervasi i Foufopoulos, 2008; Goater, 1994; Gordon i sar., 2016; Hernández-Herrera i sar., 2019; Semlitsch i sar., 1988), druge studije ukazuju na mogućnost kompenzatornog rasta tokom ranog kopnenog života metamorfa. Székely i sar. (2020) su analizirali postojanje kompenzatornog rasta kod tropske vrste *Ceratophrys stolzmanni* i potvrdili da juvenilne jedinke koje metamorfoziraju pri manjoj dužini mogu povećati svoju stopu rasta u poređenju sa većim jedinkama, čime se tokom vremena smanjuje razlika u dužini tela. Kompenzatorni rast potvrđen je i u studiji sa žutotrpbim mukačem, u kojoj su tretmani isušivanja kombinovani sa gladovanjem (Prokić i sar., 2021).

5.3 Uticaj različitih vodenih uslova i manipulacija kortikosteronom na nivo kortikosterona i parametre oksidacionog stresa

Hormonska regulacija metamorfoze kod bezrepih vodozemaca u stresnim uslovima predstavlja dinamičan proces koji uključuje međusobnu interakciju HPT i HPI ose, koje zajedno koordiniraju vremenski tok i fiziološke promene tokom prelaska iz larvalne u juvenilnu/adultnu fazu. Aktivacija HPI ose dovodi do pojačanog lučenja CORT-a, glavnog glukokortikoidnog hormona kod vodozemaca. U stresnim uslovima poput isušivanja staništa, kod vrsta koje imaju adaptivan plastičan odgovor, CORT deluje sinergistički sa TH i ubrzava metamorfozu kako bi omogućio brži prelazak u kopnenu sredinu pre nego što voda presuši (Denver, 2002, 2009; Gómez Mestre i sar., 2013; Kulkarni i sar., 2017). Proizvodnja kortikosteroida se menja tokom razvića i verovatno odražava funkcionalno sazrevanje HPI ose (Denver, 2002). Koncentracije CORT-a u krvnoj plazmi su najniže u fazama premetamorfoze (GS 26-30), rastu u fazama prometamorfoze (GS 31-41) i dostižu svoj vrhunac u metamorfnom klimaksu (GS 42) (Krug i sar., 1983; Kikuyama i sar., 1986; Niinuma i sar., 1989).

Rezultati našeg eksperimenta su pokazali da isušujući vodeni uslovi nisu doveli do promena u bazalnim nivoima CORT-a iako su jedinke izložene stresnim uslovima u GS 35 kada se očekuje da je njihov neuroendokrini sistem dovoljno razvijen za pokretanje adaptivnog odgovora. Nije bilo izvodljivo izmeriti nivo CORT-a za H tretman a samim tim ni direktno uporediti nivo CORT-a između L i H tretmana u metamorfoznom klimaksu, ali ostaje neosporna činjenica da jedinke iz ova dva tretmana imaju istu dužinu razvića nezavisno od uslova vode u kojima su odgajani. Međutim, važno je napomenuti da su koncentracije CORT-a bile različite tokom prometamorfoze i metamorfoznog klimaksa, predstavljajući

suprotan obrazac od onog ustanovljenog kod vrsta koje takođe ne mogu ubrzati razviće u isušivanju staništa. Nepromenjen nivo CORT-a među tretmanima unutar iste Gosnerove faze i jednaka dužina larvalnog perioda pod uslovima isušivanja ukazuje na prisustvo modifikacije u aktivnosti HPI ose kod žutotrbož mokača. Nažalost, malo je literature o vrstama koje nisu u stanju da ubrzaju svoje razviće pod isušivanjem (Goldberg i sar., 2022; Gordon i sar., 2016; Hernández-Herrera i sar., 2019; Kulkarni i sar., 2011, 2017; Sinsch i sar., 2020; Kijanović i sar., 2023), a znanje o fiziološkim mehanizmima koji leže u osnovi ovog fenomena je oskudno. Zbog nedostatka literature i objašnjenja o mehanizmima odgovornim za nemogućnost ubrzanja razvića pod uslovima isušivanja kod drugih vrsta, uporedili smo naše rezultate iz ove studije sa proučavanim mehanizmima kod *Scaphiopus couchii*. Kao odgovor na isušivanje staništa, dve blisko srodne vrste *S. couchii* - *Pelobates cultripes* i *Spea multiplicata* ubrzavaju svoje razviće, povećavaju standardnu metaboličku stopu i povećavaju nivo TH i CORT-a. Nasuprot tome, *S. couchii* koji ima najkraći larvalni period, ima i najviši nivo TH i CORT-a u celom telu, kao i najvišu standardnu metaboličku stopu, pri čemu su ove osobine najmanje podložne uticaju isušivanja staništa u poređenju sa druge dve vrste. Ove tri srodne vrste su se adaptirale na život u vodama različitog trajanja: *P. cultripes* polaže jaja u stalne vode i ima najduži larvalni period od tri proučavane vrste, *S. couchii* polaže jaja u efemerne vode i ima najkraći larvalni period od svih poznatih vrsta žaba, dok *S. multiplicata* zauzima staništa između stalnih i efemernih voda i njen larvalni period je takođe između larvalnog perioda dve srodne vrste. Kratak larvalni period sa gubitkom plastičnosti u ovoj osobini kod *S. couchii* predstavlja izvedeno i kanalisano razvojno stanje. Divergencija normi reakcija između ove tri srodne vrste je u skladu s evolucijom vremena metamorfoze putem genetičke akomodacije, što je bilo favorizovano selekcijom u staništima sa različitim hidroperiodima. Kod *S. couchii* nivo CORT-a ostaje konstantan i nepromenjen tokom razvića, odnosno nema razlike u CORT-u između prometamorfoze (GS 35) i metamorfoznog klimaksa (GS 42) (Kulkarni i sar., 2017). Međutim, naši rezultati su pokazali da se kod žutotrbož mokača nivo CORT-a menja i povećava od GS 35 do GS 42, što je generalni obrazac povećanja CORT-a tipičan za sve vodozemce (Chambers i sar., 2011; Regueira i sar., 2022; Ruthsatz i sar., 2023b). Nažalost, nemamo rezultate nivoa CORT-a za H tretman u metamorfoznom klimaksu, i iako se nivoi CORT-a kod žutotrbož mokača povećavaju tokom razvića u drugim tretmanima, uslovi isušivanja nemaju nikakav dodatni efekat na nivo CORT-a. Potencijalno objašnjenje za proučavanu populaciju žutotrbož mokača je da su se, zbog konstantne izloženosti stresu isušivanja tokom generacija, jedinke adaptirale na promene nivoa vode i tokom evolucije skraćivale svoj larvalni period do fiziološkog maksimuma. Ovo se može videti kroz odsustvo stresnog odgovora (odnosno kroz nivo CORT-a) i nemogućnost skraćivanja larvalnog perioda pod uslovima isušivanja. U revijalnom radu Davis i Maney (2018) su pokazali kod različitih grupa kičmenjaka da glukokortikoidni odgovor ima tendenciju smanjenja tokom vremena kod životinja koje su izložene ponovljenom stresu ili hroničnom stresu iz okoline. Shodno tome, nivoi CORT-a su nepouzdan biomarker za procenu stresa pod uslovima isušivanja kod ove vrste (Davis i Maney, 2018).

U radu Buchholz i Hayes (2005) ispitana je uloga TH u određivanju brzine metamorfoze kod porodice Scaphiropodidae. Autori su pokazali da varijacije u osetljivosti tkiva na TH (npr. ekspresija TH receptora i dejstvo dejonidaza) doprinose razlikama između vrsta u vremenu metamorfoze nezavisno od samih nivoa hormona. Studija je pokazala da su vrste sa kraćim larvalnim periodom imale viši nivo TH u tkivima i veću osetljivost tkiva na TH, što je rezultiralo bržom metamorfozom. Od tri ispitane vrste *S. couchii* je imao najveće nivo TH i najkraći larvalni period (Buchholz i Hayes, 2005). Analogno rezultatima u ovoj studiji sa TH, moguće je da kod žutotrbož mokača postoji varijacija u tkivnoj osetljivosti na nivo CORT-a što određuje da li će se ubrzanje razvića manifestovati kao odgovor na isušujuće uslove. Ako ciljna tkiva na koje deluje CORT ne odgovaraju adekvatno na prisutni hormon, onda ni visoki nivoi CORT-a neće proizvesti očekivane efekte u sušnim uslovima.

Treće moguće objašnjenje za naše rezultate je da nepromenjeni nivoi CORT-a u uslovima isušivanja kod žutotrbož mokača mogu biti posledica promena u lučenju hormona koji se nalaze uzvodno u HPI osi, poput adrenokortikotropnog hormona (ACTH) i kortikotropin-oslobađajućeg hormona (CRH). U

svojoj studiji, Denver (1997) je ubrizgao CRH slične proteine (engl. *CRH-like peptides*) punoglavcima *Spea hammondi* i to je dovelo do ubrzanja metamorfoze. Nasuprot tome, ubrzanje razvića ove vrste izazvano isušivanjem staništa oslabljeno je kada su punoglavci tretirani antagonistom CRH receptora ili pasivnom imunizacijom antiserumom protiv CRH. Punoglavci su pokazali povišene koncentracije CRH u hipotalamusu kada su reagovali (morfološki i endokrinološki) na smanjenje nivoa vode. Osim toga, punoglavci izloženi isušujućim vodenim uslovima su ispoljili porast TH i CORT-a. Kombinovanjem ovih rezultata sa nalazima da se ubrizgavanjem CRH može ubrzati metamorfoza kod više vrsta vodozemaca, Denver je došao do zaključka da je CRH ključan za adaptivne razvojne odgovore na ekološki stres, jer ovaj hormon reguliše i HPT i HPI osu. Kod žutotrbovog mukača, zbog potencijalne modifikovane proizvodnje CRH, nivo CORT-a možda ne dostiže određeni prag, koji može biti specifičan za vrstu (Davis i Maney, 2018), čime se sprečavaju morfološke i histološke promene karakteristične za metamorfozu.

Iako merenje osnovnog nivoa CORT-a u H tretmanu nije bilo moguće, očigledno je da je egzogeni CORT u H+CORT tretmanu imao negativan uticaj na sve osobine životne istorije i morfološke osobine. Tretirani metamorfi pokazuju manju dužinu tela, manju masu i sporiji rast, kao i izmenjen oblik repa. Dokumentovano je da egzogeni CORT može izazvati značajne promene u morfologiji repa punoglavaca, uključujući varijabilnost u dužini repa, razvoju repnih mišića i strukturi repnog peraja (npr. Belden i sar., 2005; Glennemeier i Denver, 2002a, 2002b) zbog smanjene regulacije hormona rasta tokom razvića kod nekih vrsta (Denver, 2009). Tretman sa metiraponom nije smanjio nivo CORT-a ali je delimično poništio negativne efekte niskih vodenih uslova na osobine životne istorije. Metamorfi iz niskog nivoa vode sa metiraponom su imali srednju dužinu tela, masu i stopu rasta između metamorfa iz H i L tretmana.

Naši rezultati su pokazali da isušujući uslovi nisu doveli do povećanja bazalnog nivoa kortikosterona. Studije su utvrdile da produženo lučenje CORT-a može promeniti ćelijski metabolizam i na kraju oštetiti biomolekule kao što su lipidi, proteini ili DNK (Therond, 2006). Konkretno, pojačan ćelijski metabolizam uključuje povećan transport metabolita i intenziviran katabolizam, što dovodi do povećane proizvodnje reaktivnih kiseoničkih vrsta (ROS). Prekomerna količina ROS-a je toksična za ćelije. Međutim, povećana aktivnost specifičnih antioksidacionih enzima može ublažiti efekat ROS-a detoksikacijom ovih molekula, čime se stabilizuju metaboličke funkcije ćelije. Slično aktivnosti antioksidacionih enzima, ćelije mogu povećati proizvodnju molekula koje služe kao hvatači slobodnih radikala, poput redukovano glutathiona, kako bi sprečile oksidaciona oštećenja. Ovi molekuli predstavljaju prvu liniju odbrane od reaktivnih vrsta (Masella i sar., 2005). Naši rezultati su pokazali da isušujući uslovi nisu doveli do promena u antioksidacionom sistemu, aktivnosti katalaze, glutathion peroksidaze i koncentracije glutathiona, dok su oksidaciona oštećenja, lipidna peroksidacija bila povišena u GS 35 u H+CORT tretmanu ali ne i u GS 42, što potvrđuje efekat CORT-a na proizvodnju ROS-a i oksidacioni status (Costantini i sar., 2011). Izloženost egzogenom CORT-u koji je doveo do oksidacionog oštećenja lipida u GS 35 dovodi do strukturno-funkcionalnih promena na ćelijskoj membrani poput smanjenja hidrofobnosti lipidnog dvosloja, promena u afinitetu i interakciji proteina i lipida, remećenja homeostaze što dovodi do disfunkcije ćelijskih procesa kao što su deljenje, endocitoza, egzocitoza, fagocitoza, prijema i prenosa signala. LPO dovodi i do opadanja vrednosti membranskog potencijala kao i povećane propustljivosti za H⁺ i druge jone (Halliwell i Gutteridge, 1999; Prokić, 2016). Međutim, LPO nije bio povećan u GS 42. Odustvo značajnih promena u oksidacionom statusu u ovom stadijumu može se povezati i sa značajem ROS-a u samom procesu metamorfoze, odnosno njihovom ulogom signalnih molekula u procesima ćelijske apoptoze i deobe. Petrović i sar. (2021) takođe nisu uočili značajne razlike između jedinki žutotrbovog mukača na početku metamorfoze. Razlike u razvojnim stadijumima su imale najveći uticaj na ispitivane parametre. Nepostojanje oksidacionog oštećenja lipida u GS 42 sugeriše da je postojeći antioksidacioni odgovor u populaciji žutotrbovog mukača dovoljan da neutrališe negativne efekte

slobodnih radikala izazvanih isušujućim uslovima. Ovo navodi na zaključak da je ispitana populacija adaptirana na isušujuće uslove koji vladaju u staništu.

Glavni i najvažniji rezultat ove disertacije je da smo utvrdili da analizirana populacija žutotrbog mukača sa Fruške gore nije ubrzala razviće u uslovima isušivanja ni u jednom od tri sprovedena eksperimenta. Plastičnost osobina jedinki u isušujućim uslovima može biti izgubljena u relativno stabilnim okruženjima, posebno kada je populacija duži vremenski period izložena fluktuirajućim ali predvidljivim niskim nivoima vode. Ovakvi uslovi u staništu dovode do smanjene sredinske osetljivosti uz istovremeno povećanje razvojne rigidnosti putem genetičke asimilacije. Genetička asimilacija predstavlja specifičan oblik genetičke akomodacije, evolutivnog mehanizma u kojem se novi fenotip, nastao usled mutacije ili ekološke perturbacije, prilagođava kroz seriju kvantitativnih genetičkih promena dok ne postane adaptivan (West-Eberhard, 2003). U slučaju genetičke asimilacije, plastičnost osobine se smanjuje do tačke u kojoj osobina postaje konstitutivno izražena, odnosno fiksna (Waddington, 1953) kao što je slučaj sa brzinom razvića žutotrbog mukača u isušujućim uslovima. Kod genetičke asimilacije, nastanak nove, kanalisane osobine ne zahteva prisustvo novih gena; umesto toga, selekcija može podstaći evoluciju nove osobine delujući na postojeću genetičku i epigenetičku varijabilnost unutar populacije (Schlichting i Pigliucci, 1998; Aubret i Shine, 2009; Pfennig i Martin, 2009, 2010). Drugim rečima, plastična osobina može postati kanalisana kroz evolutivne promene u regulaciji njene ekspresije.

S obzirom na to da je populacija žutotrbog mukača sa Fruške gore izolovana na ovom lokalitetu, koji je služio kao refugijum nakon poslednjeg ledenog doba, pretpostavlja se da su populacije ove vrste koja naseljava mala, vodena staništa koja povremeno isušuju, bile izložene predvidljivim obrascima isušivanja tokom mnogih generacija. Takvi uslovi mogli su doprineti lokalnoj adaptaciji brzine razvića na specifične hidrološke režime, nezavisno od geografske lokacije. Iako ne postoje podaci o obrascima razvića žutotrbog mukača u isušujućim staništima na drugim lokalitetima u Srbiji, isti obrazac koji je uočen u našim eksperimentima primećen je i kod različitih populacija u Nemačkoj (Kapfberger, 1984; Böll, 2002; Sinsch i sar., 2020). Ovo ilustruje kako populacije mogu postati "specijalizovane" za svoje specifične ekološke niše, čak i unutar iste vrste (Johansson i Richter-Boix, 2013). Konstantna izloženost niskim nivoima vode tokom generacija dovela je do kanalisanja brzine razvića bez mogućnosti ubrzanja nezvezano za ontogenetski stadijum u kome se jedinke izlažu ovim stresnim uslovima. Mehanizmi odgovorni za nepostojanje plastičnosti u brzini razvića kod žutotrbog mukača još uvek nisu potpuno jasni. Jedna mogućnost je da se kanalisano razviće razvilo kroz modifikaciju endokrinih signalnih puteva. Adaptacija na isušujuće uslove u staništu može se manifestovati kroz izostanak tipičnog stresnog odgovora, što se u našim rezultatima vidi kroz neizmenjene nivoe kortikosterona i parametre oksidacionog stresa, iako je plastičnost u drugim osobinama životne istorije očuvana. Gubljenje plastičnosti u jednim a zadržavanje plastičnosti u drugim osobinama, podržava koncept da plastičnost nije "sve ili ništa" karakteristika, već može biti modularno regulisana (Stojković i Tucić, 2012). Nepromenjeni nivoi CORT-a kod žutotrbog mukača u uslovima isušivanja mogu biti posledica promena u sekreciji uzvodnih hormona HPI ose, prvenstveno ACTH i CRH. Denver (1999) je pokazao da je CRH esencijalan za adaptivne razvojne odgovore na sredinski stres.

Iako naša studija ne može direktno dokazati ulogu uzvodnih hormona u regulaciji produkcije CORT-a pri isušivanju staništa, dobijeni rezultati ukazuju na potrebu za daljim istraživanjima mehanizama koji stoje iza gubitka plastičnosti u brzini razvića kod ove vrste. Štaviše, naši nalazi naglašavaju važnost istovremenog praćenja više parametara stresa, s obzirom na to da CORT nije uvek pouzdan biomarker stresa u nekim populacijama. Dodatna istraživanja genetičke asimilacije mogla bi obuhvatati komparativnu analizu populacija iz različitih ekoloških niša, poput privremenih i stalnih vodenih staništa, kako bi se identifikovali obrasci varijabilnosti u razviću. Genetičke analize usmerene na gene uključene u funkcionisanje HPI ose i odgovor na stres mogle bi pružiti uvid u molekularne osnove ove pojave. Eksperimentalno testiranje razvića u različitim vodenim režimima kroz nekoliko generacija omogućilo bi procenu naslednosti plastičnih i kanalisanih osobina, dok bi epigenetičke analize mogle otkriti

potencijalne mehanizme genetičke asimilacije. Pored toga, histološke analize štitne i adrenalnih žlezda bile bi korisne za procenu endokrinih modifikacija koje prate ovu evolutivnu promenu. Razumevanje ovog procesa kod vrsta koje ne mogu ubrzati svoje razviće u sušnim uslovima ne samo da bi obogatilo evoluciono-razvojnu biologiju, već bi i pružilo dublji uvid u načine na koje organizmi evoluiraju kao odgovor na specifične sredinske izazove. Pored fundamentalnog značaja za evolucionu biologiju, ovakva istraživanja imaju i snažne konzervacione implikacije. Vrste koje naseljavaju privremena vodena staništa, kao što je žutotrbi mukač, posebno su ranjive na promene hidroloških režima koje nastaju usled klimatskih promena, uključujući učestalije i duže periode suše. Nedostatak plastičnosti u brzini razvića može povećati rizik od lokalnih izumiranja u uslovima sve veće nepredvidivosti padavina i smanjenja dostupnosti vodenih staništa. Stoga, razumevanje evolutivnih ograničenja i sposobnosti prilagođavanja ovih vrsta ključno je za predviđanje njihovog opstanka u budućim uslovima. Ovi podaci mogu doprineti identifikaciji populacija sa visokim konzervacionim prioritetom i oblikovanju strategija očuvanja koje uključuju očuvanje i restauraciju postojećih vodenih staništa, kao i potencijalno upravljanje populacijama kroz očuvanje genetičke i fenotipske raznovrsnosti koja omogućava adaptaciju na promenljive uslove sredine.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata iz sva tri eksperimenta, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. **Isušivanje staništa ne dovodi do ispoljavanja adaptivne fenotipske plastičnosti u brzini razvića kod ispitane populacije žutotrbog mukača, što nije u skladu sa Vilbur-Kolinsovim modelom.**
2. **Iako niski vodeni uslovi nisu uticali na dužinu larvalnog perioda žutotrbog mukača, negativno su uticali na ostale osobine životne istorije.** Manja dužina tela, manja masa, stopa rasta i niži kondicioni indeks punoglavaca u tretmanima isušivanja su imali negativne prenosne efekte na juvenilnu fazu.
3. **Isušivanje staništa je dovelo do varijabilnosti u morfološkim strukturama jedinki.** Jedinke iz isušujućih tretmana su imale kraći trup i rep ali je oblik repa ostao nepromenjen. Promene u morfologiji punoglavaca su imale negativne prenosne efekte na morfologiju juvenilnih jedinki. Jedinke iz isušujućih tretmana su imale kraći stilopodijalni i zeugopodijalni deo zadnjih ekstremiteta ali se to nije odrazilo na skakačke performanse metamorfoziranih jedinki.
4. **Ne postoji određen period (razvojni prozor) u razviću žutotrbog mukača kada je moguće ubrzanje razvića kao odgovor na isušujuće uslove, što ne podržava Travisov model dinamičke alokacije resursa.** Izlaganje stresnim vodenim uslovima u tri ontogenetske tačke je pokazalo da isušivanje staništa ima najnegativniji uticaj na osobine životne istorije žutotrbog mukača u ranim fazama razvića (GS 30-32; L1 tretman). Ovakvi rezultati ukazuju na postojanje fiksne razvojne stope kod žutotrbog mukača.
5. **Isušivanje staništa ne utiče na nivo kortikosterona žutotrbog mukača što ukazuje na modifikaciju HPI ose.**
6. **Egzogeno dodat kortikosteron u visoke vodene uslove na stadijumu prometamorfoze, nije doveo do ubrzanja razvića jedinki žutotrbog mukača što je u suprotnosti sa teorijskim pretpostavkama.**
7. **Isušivanje staništa nije dovelo do promena u parametrima antioksidacionog sistema niti do oksidacionog oštećenja lipida.** Ovakvi rezultati navode na zaključak da je ispitana populacija adaptirana na isušujuće uslove koji vladaju u staništu i da je postojeća aktivnost ovog sistema u populaciji žutotrbog mukača dovoljna da neutrališe negativne efekte slobodnih radikala izazvanih isušujućim uslovima.
8. **Rezultati sva tri eksperimenta ukazuju da je populacija žutotrbog mukača sa Fruške gore lokalno adaptirana na hidrološke uslove, i da je verovatno konstantna izloženost niskim nivoima vode tokom generacija dovela do kanalsanja brzine razvića putem genetičke asimilacije.**

7. LITERATURA

- Abele, D., Vazquez-Medina, J.P., & Zenteno-Savin, T. (2011). Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems. *John Wiley and Sons*, UK.
- Adams, M.J. (2000). Pond permanence and the effects of exotic vertebrates on anurans. *Ecological Applications*, **10(2)**, 559–568.
- Albecker, M.A., & McCoy, M.W. (2019). Local adaptation for enhanced salt tolerance reduces non-adaptive plasticity caused by osmotic stress. *Evolution*, **73(9)**, 1941–1957.
- Alford, R.A., & Harris, R.N. (1988). Effects of larval growth history on anuran metamorphosis. *The American Naturalist*, **131(1)**, 91–106.
- Altwegg, R., & Reyer, H.U. (2003). Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution*, **57**, 872–882.
- Alvarez, D., & Nicieza, A.G. (2002). Effects of induced variation in anuran larval development on postmetamorphic energy reserves and locomotion. *Oecologia*, **131**, 186–195.
- Amburgey, S., Funk, W.C., Murphy, M., & Muths, E. (2012). Effects of hydroperiod duration on survival, developmental rate, and size at metamorphosis in boreal chorus frog tadpoles (*Pseudacris maculata*). *Herpetologica*, **68(4)**, 456–467.
- Arntzen, J.W. (1978). Some hypotheses on postglacial migrations of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* (Linnaeus) and the yellow-bellied toad, *Bombina variegata* (Linnaeus). *Journal of Biogeography*, 339–345.
- Aubret, F., & Shine, R. (2009). Genetic assimilation and the postcolonization erosion of phenotypic plasticity in island tiger snakes. *Current Biology*, **19(22)**, 1932–1936.
- Audo, M.C., Mann, T.M., Polk, T.L., Loudenslager, C.M., Diehl, W.J., & Altig, R. (1995). Food deprivation during different periods of tadpole (*Hyla chrysoscelis*) ontogeny affects metamorphic performance differently. *Oecologia*, **103**, 518–522.
- Auld, J.R., Agrawal, A.A., & Relyea, R.A. (2010). Re-evaluating the costs and limits of adaptive phenotypic plasticity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **277(1681)**, 503–511.
- Bagwill, A.L., Lovern, M.B., Worthington, T.A., Smith, L.M., & McMurry, S.T. (2016). Effects of water loss on New Mexico spadefoot toad (*Spea multiplicata*) development, spleen cellularity, and corticosterone levels. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, **325(8)**, 548–561.
- Băncilă, R.I., Hartel, T., Plăiașu, R., Smets, J., & Cogălniceanu, D. (2010). Comparing three body condition indices in amphibians: a case study of yellow-bellied toad *Bombina variegata*. *Amphibia-Reptilia*, **31(4)**, 558–562.
- Barandun, J. (1990). Reproduction of yellow-bellied toads *Bombina variegata* in a man-made habitat. *Amphibia-Reptilia*, **11(3)**, 277–284.
- Barandun, J., & Reyer, H.U. (1997a). Reproductive ecology of *Bombina variegata*: development of eggs and larvae. *Journal of Herpetology*, **31(1)**, 107–110.

- Barandun, J., & Reyer, H.U. (1997b). Reproductive ecology of *Bombina variegata*: aspects of life history. *Amphibia-Reptilia*, **18(4)**, 347–355.
- Barandun, J., & Reyer, H.U. (1998). Reproductive ecology of *Bombina variegata*: habitat use. *Copeia*, **1998(2)**, 497–500.
- Bates, D., Sarkar, D., Bates, M.D., Matrix, L. (2007). The lme4 package. R package version, **2(1)**, 74.
- Beachy, C.K., Surges, T.H., & Reyes, M. (1999). Effects of developmental and growth history on metamorphosis in the gray treefrog, *Hyla versicolor* (Amphibia, Anura). *Journal of Experimental Zoology*, **283(6)**, 522–530.
- Beck, C.W., & Congdon, J.D. (2000). Effects of age and size at metamorphosis on performance and metabolic rates of Southern Toad, *Bufo terrestris*, metamorphs. *Functional Ecology*, **14**, 32–38.
- Belden, L.K., Moore, I.T., Wingfield, J.C., & Blaustein, A.R. (2005). Corticosterone and growth in Pacific treefrog (*Hyla regilla*) tadpoles. *Copeia*, **2005(2)**, 424–430.
- Benard, M.F. (2004). Predator-induced phenotypic plasticity in organisms with complex life histories. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **35**, 651–673.
- Bender, M.C, Hu, C., Pelletier, C., & Denver, R.J. (2018). To eat or not to eat: ontogeny of hypothalamic feeding controls and a role for leptin in modulating life-history transition in amphibian tadpoles. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **285(1875)**, 20172784.
- Bernhardt, E.S., Rosi, E.J., & Gessner, M.O. (2017). Synthetic chemicals as agents of global change. *Frontiers in Ecology and the Environment*, **15(2)**, 84–90.
- Berrigan, D., & Koella, J.C. (1994). The evolution of reaction norms – simple-models for age and size at maturity. *Journal of Evolutionary Biology*, **7**, 549–566.
- Blouin, M.S., & Brown, S.T. (2000). Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis. *Oecologia*, **125**, 358–361.
- Boelter, T., dos Santos, F.M., Moreira, L.F.B., Stenert, C., Reichard, M., & Maltchik, L. (2020). Effects of hydroperiod on morphology of tadpoles from highland ponds. *Aquatic Ecology*, **54(4)**, 1145–1153.
- Böll, S. (2002). Ephemere Laichgewässer: Anpassungsstrategien und physiologische Zwänge der Gelbbauchunke (*Bombina variegata*) in einem Lebensraum mit unvorhersehbarem Austrocknungsrisiko. PhD thesis, Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg, Würzburg.
- Bookstein, F.L. (1997). Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. *Cambridge University Press*. UK.
- Boorse, G.C., & Denver, R.J. (2003). Endocrine mechanisms underlying plasticity in metamorphic timing in spadefoot toads. *Integrative and Comparative Biology*, **43(5)**, 646–657.
- Bradshaw, W.E, & Johnson, K. (1995). Initiation of metamorphosis in the pitcher-plant mosquito – effects of larval growth history. *Ecology*, **76**, 2055–2065.
- Brown, G.W. (1964). The metabolism of Amphibia. In: Moore, J.A. (Ed.), *Physiology of Amphibia*. Academic Press, New York, 1–98.
- Buchholz, D.R., & Hayes, T.B. (2002). Evolutionary patterns of diversity in spadefoot toad metamorphosis (Anura: Pelobatidae). *Copeia*, **2002(1)**, 180–189.

- Buchholz, D.R., & Hayes, T.B. (2005). Variation in thyroid hormone action and tissue content underlies species differences in the timing of metamorphosis in desert frogs. *Evolution and development*, **7(5)**, 458–467.
- Burraco, P., Díaz-Paniagua, C., & Gómez Mestre, I. (2017). Different effects of accelerated development and enhanced growth on oxidative stress and telomere shortening in amphibian larvae. *Scientific Reports*, **7**, 7494.
- Callahan, H.S., Maughan, H., & Steiner, U.K. (2008). Phenotypic plasticity, costs of phenotypes, and costs of plasticity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1133(1)**, 44–66.
- Castellano, S., Cucco, M., Giacoma, C. (2004): Reproductive investment of female green toads (*Bufo viridis*). *Copeia*, **3**, 659–664.
- Chambers, D.L., Wojdak, J.M., Du, P., & Belden, L.K. (2011). Corticosterone level changes throughout larval development in the amphibians *Rana sylvatica* and *Ambystoma jeffersonianum* reared under laboratory, mesocosm, or free-living conditions. *Copeia*, **2011(4)**, 530–538.
- Charbonnier, J.F., & Vonesh, J.R. (2015). Consequences of life history switch point plasticity for juvenile morphology and locomotion in the Túngara frog. *PeerJ*, **3**, e1268.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P.C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **61(2)**, 192–208.
- Chevin, L.M., Lande, R., & Mace, G.M. (2010). Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. *PLoS biology*, **8(4)**, e1000357.
- Chevin, L.M., Gallet, R., Gomulkiewicz, R., Holt, R.D., & Fellous, S. (2013). Phenotypic plasticity in evolutionary rescue experiments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **368(1610)**, 20120089.
- Claiborne, A. (1984). Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, 283–284.
- Collins, J.P. (1979). Intrapopulation variation in the body size at metamorphosis and timing of metamorphosis in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Ecology*, **60**, 738–749.
- Conover, D.O., & Schultz, E.T. (1995). Phenotypic similarity and the evolutionary significance of countergradient variation. *Trends in Ecology and Evolution*, **10(6)**, 248–252.
- Cook, M.T., Heppell, S.S., & Garcia, T.S. (2013). Invasive bullfrog larvae lack developmental plasticity to changing hydroperiod. *The Journal of Wildlife Management*, **77(4)**, 655–662.
- Costantini, D. (2008). Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. *Ecology letters*, **11(11)**, 1238–1251.
- Costantini, D. (2024). *The Role of Organismal Oxidative Stress in the Ecology and Life-History Evolution of Animals*. Springer Nature Switzerland AG, 2024.
- Costantini, D., Marasco, V., & Møller, A.P. (2011). A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. *Journal of Comparative Physiology B*, **181**, 447–456.
- Crump, M.L. (1989). Effect of habitat drying on developmental time and size at metamorphosis in *Hyla pseudopuma*. *Copeia*, **1989(3)**, 794–797.

- Cvijanović, M. (2010). Evolucija velikih mrmoljaka, *Triturus cristatus superspecies* (Salamandridae, Caudata): odlike životne istorije i ontogenija oblika. Doctoral dissertation, University of Belgrade, Faculty of Biology.
- D'Angelo, S.A., Gordon, A.S., & Charipper, H.A. (1941). The role of the thyroid and pituitary glands in the anomalous effect of inanition on amphibian metamorphosis. *Journal of Experimental Zoology*, **87**, 259–275.
- Das, B., Matsuda, H., Fujimoto, K., Sun, G., Matsuura, K., & Shi, Y.B. (2010). Molecular and genetic studies suggest that thyroid hormone receptor is both necessary and sufficient to mediate the developmental effects of thyroid hormone. *General and comparative endocrinology*, **168(2)**, 174–180.
- Davidson, A.M., Jennions, M., & Nicotra, A.B. (2011). Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive? A meta-analysis. *Ecology letters*, **14(4)**, 419–431.
- Davis, A.K., & Maney, D.L. (2018). The use of glucocorticoid hormones or leucocyte profiles to measure stress in vertebrates: What's the difference? *Methods in Ecology and Evolution*, **9(6)**, 1556–1568.
- Day, T., & Rowe, L. (2002). Developmental thresholds and the evolution of reaction norms for age and size at life-history transitions. *The American Naturalist*, **159(4)**, 338–350.
- De Block, M., & Stoks, R. (2008). Compensatory growth and oxidative stress in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **275(1636)**, 781–785.
- Debat, V., & David, P. (2001). Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends in ecology and evolution*, **16(10)**, 555–561.
- Dechaine, J.M., Johnston, J.A., Brock, M.T., & Weinig, C. (2007). Constraints on the evolution of adaptive plasticity: costs of plasticity to density are expressed in segregating progenies. *New Phytologist*, **176(4)**, 874–882.
- Denoël, M., Hervant, F., Schabetsberger, R., & Joly, P. (2002). Short- and long-term advantages of an alternative ontogenetic pathway. *Biological Journal of the Linnean Society*, **77(1)**, 105–112.
- Denver, R.J. (1997). Environmental stress as a developmental cue: corticotropin-releasing hormone is a proximate mediator of adaptive phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. *Hormones and behavior*, **31(2)**, 169–179.
- Denver, R.J., Mirhadi, N., & Phillips, M. (1998). Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: Response of *Scaphiopus hammondi* tadpoles to habitat desiccation. *Ecology*, **79(6)**, 1859–1872.
- Denver, R.J. (1999). Evolution of the corticotropin - releasing hormone signaling system and its role in stress - induced phenotypic plasticity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **897(1)**, 46–53.
- Denver, R.J., Glennemeier, K.A., & Boorse, G.C. (2002). Endocrinology of complex life cycles: amphibians. In: Pfaff, D., Arnold, A., Etgen, A., Fahrback, S., Rubin, R. (Eds.), *Hormones, brain and behaviour*. Academic Press, London, 469–513.
- Denver, R.J. (2009). Structural and functional evolution of vertebrate neuroendocrine stress systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1163(1)**, 1–16.
- Denver, R.J., (2013). Neuroendocrinology of amphibian metamorphosis. *Current Topics in Developmental Biology*, **103**, 195–227.

- Denver, R.J. (2021). Stress hormones mediate developmental plasticity in vertebrates with complex life cycles. *Neurobiology of Stress*, **14**, 100301.
- DeWitt, T.J., Sih, A., & Wilson, D.S. (1998). Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in ecology and evolution*, **13(2)**, 77–81.
- Dittrich, C., Drakulić, S., Schellenberg, M., Thein, J., & Rödel, M.O. (2016). Some like it hot? Developmental differences in Yellow-bellied Toad (*Bombina variegata*) tadpoles from geographically close but different habitats. *Canadian Journal of Zoology*, **94(2)**, 69–77.
- Dmitriew, C.M. (2011). The evolution of growth trajectories: what limits growth rate? *Biological Reviews*, **86(1)**, 97–116.
- Dobson, F.S. (1992). Body mass, structural size, and life-history patterns of the Columbian ground squirrel. *American Naturalist*, **140**, 109–125.
- Dodd, M.H.I., & Dodd, J.M. (1976). The biology of metamorphosis. In: Lofts, B. (Ed.), *Physiology of the amphibia*. Academic Press, New York, 467–599.
- Downie, J.R., Bryce, R., & Smith, J. (2004). Metamorphic duration: an under-studied variable in frog life histories. *Biological Journal of the Linnean Society*, **83(2)**, 261–272.
- Draghi, J.A., & Whitlock, M.C. (2012). Phenotypic plasticity facilitates mutational variance, genetic variance, and evolvability along the major axis of environmental variation. *Evolution*, **66(9)**, 2891–2902.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, **82(1)**, 47–95.
- Dryden, I.L., & Mardia, K.V. (1998). Statistical shape analysis. *Statistics in medicine*, **19(19)**, 2716–2717.
- Duellman, W.E., & Trueb, L. (1994). *Biology of amphibians*. JHU press.
- Dworkin, I. (2005). Canalization, cryptic variation, and developmental buffering: a critical examination and analytical perspective. *Variation*, 131–158.
- Ebenman, B. (1992). Evolution in organisms that change their niches during the life cycle. *The American Naturalist*, **139(5)**, 990–1021.
- Emerson, S.B. (2000). Vertebrate secondary sexual characteristics - physiological mechanisms and evolutionary patterns. *The American Naturalist*, **156(1)**, 84–91.
- Enriquez-Urzelai, U., San Sebastian, O., Garriga, N., & Llorente, G.A. (2013). Food availability determines the response to pond desiccation in anuran tadpoles. *Oecologia*, **173(1)**, 117–127.
- Etkin, W. (1932). Growth and resorption phenomena in anuran metamorphosis. I. *Physiological Zoology*, **5(2)**, 275–300.
- Fabian, D., & Flatt, T. (2012). Life history evolution. *Nature Education Knowledge*, **3(10)**, 24.
- Frieden, E., & Naile, B. (1955). Biochemistry of amphibian metamorphosis: I. Enhancement of induced metamorphosis by gluco-corticoids. *Science*, **121(3132)**, 37–39.
- Gervasi, S.S., & Foufopoulos, J. (2008). Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Functional Ecology*, **22(1)**, 100–108.

- Ghalambor, C.K., McKay, J.K., Carroll, S.P., & Reznick, D.N. (2007). Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional ecology*, **21(3)**, 394–407.
- Ghalambor, C.K., Hoke, K.L., Ruell, E.W., Fischer, E.K., Reznick, D.N., & Hughes, K.A. (2015). Non-adaptive plasticity potentiates rapid adaptive evolution of gene expression in nature. *Nature*, **525(7569)**, 372–375.
- Gibert, P., Debat, V., & Ghalambor, C.K. (2019). Phenotypic plasticity, global change, and the speed of adaptive evolution. *Current opinion in insect science*, **35**, 34–40.
- Glennemeier, K.A., & Denver, R.J. (2002a). Small changes in whole-body corticosterone content affect larval *Rana pipiens* fitness components. *General and comparative endocrinology*, **127(1)**, 16–25.
- Glennemeier, K.A., & Denver, R.J. (2002b). Role for corticoids in mediating the response of *Rana pipiens* tadpoles to intraspecific competition. *Journal of Experimental Zoology*, **292(1)**, 32–40.
- Goater, C.P. (1994). Growth and survival of postmetamorphic toads: Interactions among larval history, density, and parasitism. *Ecology*, **75(8)**, 2264–2274.
- Goldberg, J., Quinzio, S.I., & Vaira, M. (2022). Lack of response to pond desiccation by eggs and tadpoles of the Yungas Red-belly Toad (*Melanophryniscus rubriventris*) in an unpredictable environment. *Canadian Journal of Zoology*, **100(5)**, 296–302.
- Gómez, V.I., & Kehr, A.I. (2019). Habitat size changes morphological traits of *Physalaemus albonotatus* tadpoles. *Tropical zoology*, **32(1)**, 37–48.
- Gómez Mestre, I., & Buchholz, D.R. (2006). Developmental plasticity mirrors differences among taxa in spadefoot toads linking plasticity and diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103(50)**, 19021–19026.
- Gómez Mestre, I., Saccoccio, V.L., Iijima, T., Collins, E.M., Rosenthal, G.G. & Warkentin, K.M. (2010). The shape of things to come: linking developmental plasticity to post-metamorphic morphology in anurans. *Journal of Evolutionary Biology*, **23**, 1364–1373.
- Gómez Mestre, I., & Jovani, R. (2013). A heuristic model on the role of plasticity in adaptive evolution: plasticity increases adaptation, population viability and genetic variation. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **280(1771)**, 20131869.
- Gómez Mestre, I., Kulkarni, S., & Buchholz, D.R. (2013). Mechanisms and consequences of developmental acceleration in tadpoles responding to pond drying. *PLoS one*, **8(12)**, e84266.
- Gordon, A.M., Youngquist, M.B., & Boone, M.D. (2016). The effects of pond drying and predation on Blanchard's cricket frogs (*Acris blanchardi*). *Copeia*, **104(2)**, 482–486.
- Gosner, K.L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, **16(3)**, 183–190.
- Gould, S.J. (1966). Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biological Reviews*, **41**, 587–640.
- Gramapurohit, N.P., Shanbag, B.A., & Saidapur, S.K. (1998). Pattern of growth and utilization of abdominal fat bodies during larval development and metamorphosis in five South Indian anurans. *Current Science*, **75(11)**, 1189–1193.

- Grandison, A.G.C., & Ashe, S. (1983). The distribution, behavioural ecology and breeding strategy of the pygmy toad, *Mertensophryne micranotis* (Lov.). *Bulletin of the British Museum of Natural History, Zoology*, London, **45(2)**, 85–93.
- Griffith, O.W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, **106**, 207–212.
- 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.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Edition. Oxford University Press, Oxford, 1–25.
- Hanada, H., Kashiwagi, A., Takehara, Y., Kanno, T., Yabuki, M., Sasaki, J., Inoue, M., & Utsumi, K. (1997). Do reactive oxygen species underlie the mechanism of apoptosis in the tadpole tail? *Free Radical Biology and Medicine*, **23**, 294–301.
- Hanken, J. (1992). Life history and morphological evolution. *Journal of Evolutionary Biology*, **5(4)**, 549–557.
- Hansen, M.J. (2005). A method for correcting the relative weight (Wr) index for seasonal patterns in relative condition (Kn) with length as applied to walleye in Wisconsin. *North American Journal of Fisheries Management*, **25**, 1256–1262.
- Hartel, T., Nemes, S. & Mara, G. (2007). Breeding phenology and spatio-temporal dynamics of pond use by the yellow-bellied toad (*Bombina variegata*) population: the importance of pond availability and duration. *Acta Zoologica Lituanica*, **17(1)**, 56–63.
- Hayes, T.B., Chan, R., & Licht, P. (1993). Interactions of temperature and steroids in larval growth, development, and metamorphosis in a toad (*Bufo boreas*). *Journal of Experimental Zoology*, **266**, 206–215.
- Hayes, T.B. (1995). Histological examination of the effects of corticosterone in larvae of the western toad, *Bufo boreas* (Anura: Bufonidae), and the oriental fire-bellied toad, *Bombina orientalis* (Anura: Discoglossidae). *Journal of Morphology*, **226**, 297–307.
- Hensley, F.R. (1993). Ontogenetic loss of phenotypic plasticity of age at metamorphosis in tadpoles. *Ecology*, **74(8)**, 2405–2412.
- Hernández-Herrera, C.I., Perez-Mendoza, H.A., & Golubov, J. (2019). Effects of temperature and desiccation on the morphology, body condition, and metamorphosis of tadpoles and froglets of *Agalychnis moreletii*. *Evolutionary Ecology Research*, **20(4)**, 451–467.
- Hoey, A.S., McCormick, M.I. (2004). Selective predation for low body condition at the larval - juvenile transition of a coral reef fish. *Oecologia*, **139**, 23–29.
- Hoverman, J.T., & Relyea, R.A. (2007). How flexible is phenotypic plasticity? Developmental windows for trait induction and reversal. *Ecology*, **88(3)**, 693–705.
- Ilić, M., Jojić, V., Stamenković, G., Marković, V., Simić, V., Paunović, M., & Crnobrnja-Isailović, J. (2019). Geometric vs. traditional morphometric methods for exploring morphological variation of tadpoles at early developmental stages. *Amphibia-Reptilia*, **40(4)**, 499–509.
- Inns, H. (2011). Britain's reptiles and amphibians: a guide to the reptiles and amphibians of Great Britain, Ireland and the Channel Islands. *Princeton University Press*, **23**.

- Ivanović, A., & Kalezić, M. (2013). Evolucionarna morfologija. Teorijske postavke i geometrijska morfometrija. *Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu*.
- Johansson, F., Hjelm, J., & Giles, B.E. (2005). Life history and morphology of *Rana temporaria* in response to pool permanence. *Evolutionary Ecology Research*, **7(7)**, 1025–1038.
- Johansson, F., Lederer, B., & Lind, M.I. (2010). Trait performance correlations across life stages under environmental stress conditions in the common frog, *Rana temporaria*. *PLoS one*, **5(7)**, e11680.
- Johansson, F., & Richter-Boix, A. (2013). Within-population developmental and morphological plasticity is mirrored in between-population differences: Linking plasticity and diversity. *Evolutionary Biology*, **40(4)**, 494–503.
- Johansson, F., Richter-Boix, A., & Gómez Mestre, I. (2016). Morphological consequences of developmental plasticity in *Rana temporaria* are not accommodated into among - population or among - species variation. *Evolutionary biology*, **43**, 242–256.
- Johnson, J., Manzo, W., Gardner, E., & Menon, J. (2013). Reactive oxygen species and anti-oxidant defenses in tail of tadpoles, *Xenopus laevis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, **158**, 101–108.
- Kalezić, M., & Tomović, Lj. (2007). Hordati. *NNK Internacional*, Beograd.
- Kapfberger, D. (1984). Untersuchungen zu populationsaufbau, wachstum und ortsbeziehungen der gelbbauchunke, *Bombina variegata variegata* (Linnaeus, 1758). *Zoologischer Anzeiger*, **212**, 105–116.
- Kashiwagi, A., Hanada, H., Yabuki, M., Kanno, T., Ishisaka, R., Sasaki, J., Inoue, M., & Utsumi, K. (1999). Thyroxine enhancement and the role of reactive oxygen species in tadpole tail apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1001–1009.
- Katzenberger, M., Hammond, J., Duarte, H., Tejedo, M., Calabuig, C., & Relyea, R.A. (2014). Swimming with predators and pesticides: how environmental stressors affect the thermal physiology of tadpoles. *PLoS one*, **9(5)**, e98265.
- Kawecki, T.J., & Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology letters*, **7(12)**, 1225–1241.
- Kijanović, A., Vukov, T., Mirč, M., Krizmanić, I., & Tomašević Kolarov, N. (2023). Inability of yellow-bellied toad to accelerate metamorphosis in desiccation conditions. *Journal of Zoology*, **320(2)**, 96–107.
- Kijanović, A., Vukov, T., Mirč, M., Mitrović, A., Prokić, M.D., Petrović, T.G., Radovanović, T.B., Gavrilović, B.R., Despotović, S.G., Gavrić, J.P., & Tomašević Kolarov, N. (2024). The role of phenotypic plasticity and corticosterone in coping with pond drying conditions in yellow-bellied toad (*Bombina variegata*, Linnaeus 1758) tadpoles. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, **341(7)**, 753–765.
- Kikuyama, S., Suzuki, M.R., & Iwamuro, S. (1986). Elevation of plasma aldosterone levels of tadpoles at metamorphic climax. *General and Comparative Endocrinology*, **63**, 186–190.
- Kikuyama, S., Inaco, H., Jenks, B.G., & Kawamura, K. (1993). Development of the ectopically transplanted primordium of epithelial hypophysis (anterior neural ridge) in *Bufo japonicus* embryos. *Journal of Experimental Zoology*, **266(3)**, 216–220.
- 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.
- Krug, E.C, Honn, K.V, Battista, J., & Nicoll, C.S. (1983). Corticosteroids in serum of *Rana catesbeiana* during development and metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology*, **52**, 232–241.
- Kruidenier, L.A., & Verspaget, H.W. (2002). Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease-radicals or ridiculous? *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, **16(12)**, 1997–2015.
- Kulkarni, S.S., Gómez Mestre, I., Moskalik, C.L., Storz, B.L., & Buchholz, D.R. (2011). Evolutionary reduction of developmental plasticity in desert spadefoot toads. *Journal of Evolutionary Biology*, **24(11)**, 2445–2455.
- Kulkarni, S.S., Denver, R.J., Gómez Mestre, I., & Buchholz, D.R. (2017). Genetic accommodation via modified endocrine signalling explains phenotypic divergence among spadefoot toad species. *Nature Communications*, **8(1)**, 993.
- Leips, J, & Travis, J. (1994). Metamorphic responses to changing food levels in two species of hyliid frogs. *Ecology*, **75**, 1345–1356.
- Lent, E.M., & Babbitt, K.J. (2020). The effects of hydroperiod and predator density on growth, development, and morphology of wood frogs (*Rana sylvatica*). *Aquatic Ecology*, **54(1)**, 369–386.
- Levis, N.A., Schooler, M.L., Johnson, J.R., & Collyer, M.L. (2016). Non-adaptive phenotypic plasticity: the effects of terrestrial and aquatic herbicides on larval salamander morphology and swim speed. *Biological Journal of the Linnean Society*, **118(3)**, 569–581.
- Lind, M. (2009). Phenotypic plasticity and local adaptation in island populations of *Rana temporaria*. Doctoral dissertation, Department of Ecology & Environmental Science, Umeå University.
- Lind, M.I., & Johansson, F. (2007). The degree of adaptive phenotypic plasticity is correlated with the spatial environmental heterogeneity experienced by island populations of *Rana temporaria*. *Journal of evolutionary biology*, **20(4)**, 1288–1297.
- Lind, M.I., Persbo, F., & Johansson, F. (2008). Pool desiccation and developmental thresholds in the common frog, *Rana temporaria*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **275(1638)**, 1073–1080.
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Giordano, M., & Schettino, T., (2005). Acetylcholinesterase as biomarker in environmental biomonitoring. *Biomedical Health Research Commission European Communities Then Ios, Press*, **63**, 91.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265–275.
- Maia, A.D.H., Luiz, A.J., & Campanhola, C. (2000). Statistical inference on associated fertility life table parameters using jackknife technique: computational aspects. *Journal of Economic Entomology*, **93(2)**, 511–518.

- Márquez-García, M., Correa-Solis, M., Sallaberry, M., & Méndez, M.A. (2009). Effects of pond drying on morphological and life-history traits in the anuran *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae). *Evolutionary Ecology Research*, **11(5)**, 803–815.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione - related enzymes. *The Journal of nutritional biochemistry*, **16(10)**, 577–586.
- Mausbach, J., Laurila, A., & Räsänen, K. (2022). Context dependent variation in corticosterone and phenotypic divergence of *Rana arvalis* populations along an acidification gradient. *BMC Ecology and Evolution*, **22(1)**, 11.
- Milosavljević, M., Stanojević, S., Katić, P., & Todorović, N. (1973). Klimatske prilike Fruške gore. *Matica srpska*, Novi Sad.
- Mirč, M.P. (2021). Karakterizacija ekološkog i konzervacionog statusa zidnog guštera (*Podarcis muralis*) u Vojvodini, Srbija. Doctoral dissertation, University of Belgrade, Faculty of Biology.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, **7(9)**, 405–410.
- Mogali, S., Saidapur, S., & Shanbhag, B. (2017). Influence of desiccation threat on the metamorphic traits of the Asian common toad, *Duttaphrynus melanostictus* (Anura). *Acta Herpetologica*, **12(2)**, 175–180.
- Monteiro, L.R. (1999). Multivariate regression models and geometric morphometrics: the search for causal factors in the analysis of shape. *Systematic Biology*, **48(1)**, 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.
- Morey, S., & Reznick, D. (2000). A comparative analysis of plasticity in larval development in three species of spadefoot toads. *Ecology*, **81(6)**, 1736–1749.
- Moritz, C., & Agudo, R. (2013). The future of species under climate change: resilience or decline? *Science*, **341(6145)**, 504–508.
- Morris, M.R., & Rogers, S.M. (2013). Overcoming maladaptive plasticity through plastic compensation. *Current Zoology*, **59(4)**, 526–536.
- Nauwelaerts, S., & Aerts, P. (2006). Take-off and landing forces in jumping frogs. *Journal of Experimental Biology*, **209(1)**, 66–77.
- Newman, R.A. (1987). Effects of density and predation on *Scaphiopus couchii* tadpoles in desert ponds. *Oecologia*, **71**, 301–307.
- Newman, R.A. (1989). Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology*, **70(6)**, 1775–1787.
- Newman, R.A. (1992). Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis. *BioScience*, **42(9)**, 671–678.
- Newman, R.A., & Dunham, A.E. (1994). Size at metamorphosis and water loss in a desert anuran (*Scaphiopus couchii*). *Copeia*, **1994**, 372–381.
- Nicieza, A.G., Alvarez, D., & Atienza, E.M.S. (2006). Delayed effects of larval predation risk and food quality on anuran juvenile performance. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 1092–1103.

- Niinuma, K., Mamiya, N., Yamamoto, K., Iwamuro, S., Vaudry, H., & Kikuyama, S. (1989). Plasma concentrations of aldosterone and prolactin in *Bufo japonicus* tadpoles during metamorphosis. *Bulletin of the Science and Engineering Research Laboratory*, **122**, 17–21.
- Nilsson-Örtman, V., & Rowe, L. (2021). The evolution of developmental thresholds and reaction norms for age and size at maturity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **118(7)**, e2017185118.
- O'Regan, S.M., Palen, W.J., & Anderson, S.C. (2014). Climate warming mediates negative impacts of rapid pond drying for three amphibian species. *Ecology*, **95(4)**, 845–855.
- Orizaola, G., & Laurila, A. (2009). Microgeographic variation in the effects of larval temperature environment on juvenile morphology and locomotion in the pool frog. *Journal of Zoology*, **277(4)**, 267–274.
- Orizaola, G., Dahl, E., & Laurila, A. (2012). Reversibility of predator-induced plasticity and its effect at a life-history switch point. *Oikos*, **121(1)**, 44–52.
- Pacifici, M., Foden, W.B., Visconti, P., Watson, J.E., Butchart, S.H.M., Kovacs, K.M., Scheffers, B.S., Hole, D.G., Martin, T.G., Akçakaya, H.R., Corlett, R.T., Huntley, B., Bickford, D., Carr, J.A., Hoffmann, A.A., Midgley, G.F., Pearce-Kelly, P., Pearson, R.G., Williams, S.E., Willis, S.G., Young, B., & Rondinini, C. (2015). Assessing species vulnerability to climate change. *Nature Climate Change*, **5(3)**, 215–224.
- Palmer, G., Platts, P.J., Brereton, T., Chapman, J.W., Dytham, C., Fox, R., Pearce-Higgins, J.W., Roy, D.B., Hill, J.K., & Thomas, C.D. (2017). Climate change, climatic variation and extreme biological responses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **372(1723)**, 20160144.
- Peig, J., & Green, A.J. (2009). New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos*, **118(12)**, 1883–1891.
- Petrović, T.G. (2020). Morfološka varijabilnost i obrasci korelacija elemenata ekstremiteta bezrepih vodozemaca (Anura, Amphibia). Doctoral dissertation, University of Belgrade, Faculty of Biology.
- Petrović, T.G., Kijanović, A., Tomašević Kolarov, N., Gavrić, J.P., Despotović, S.G., Gavrilović, B.R., Radovanović, T.B., Vukov, T., Faggio, C., & Prokić, M.D. (2021). Effects of desiccation on metamorphic climax in *Bombina variegata*: Changes in levels and patterns of oxidative stress parameters. *Animals*, **11(4)**, 953.
- Pfennig, D.W. (2021). Phenotypic plasticity and evolution: causes, consequences, controversies. In: Pfennig, D.W. (Ed.), Phenotypic plasticity and evolution: causes, consequences, controversies. 1st Edition. Taylor and Francis, 436.
- Pfennig, D.W., & Martin, R.A. (2009). A maternal effect mediates rapid population divergence and character displacement in spadefoot toads. *Evolution*, **63**, 898–909.
- Pfennig, D.W., & Martin, R.A. (2010). Evolution of character displacement in spadefoot toads: different proximate mechanisms in different species. *Evolution*, **64**, 2331–2341.
- Pfennig, D.W., Wund, M.A., Snell-Rood, E.C., Cruickshank, T., Schlichting, C.D., & Moczek, A.P. (2010). Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends in ecology and evolution*, **25(8)**, 459–467.
- Phillips, B.L., Brown, G.P., Webb, J.K., & Shine, R. (2006). Invasion and the evolution of speed in toads. *Nature*, **439 (7078)**, 803.

- Pigliucci, M., Murren, C.J., & Schlichting, C.D. (2006). Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *Journal of Experimental Biology*, **209**(12), 2362–2367.
- Price, T.D., Qvarnström, A., & Irwin, D.E. (2003). The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **270**(1523), 1433–1440.
- Prokić, M.D. (2016). Parametri antioksidacionog sistema u tkivima žaba *Pelophylax esculentus* kompleksa kao biomarkeri izlaganja metalima. Doctoral dissertation, University of Belgrade, Faculty of Biology.
- Prokić, M.D., Petrović, T.G., Gavrilović, B.R., Despotović, S.G., Gavrić, J.P., Kijanović, A., Tomašević Kolarov, N., Vukov, T., & Radovanović, T.B. (2021). Carry-over effects of desiccation stress on the oxidative status of fasting anuran juveniles. *Frontiers in Physiology*, **12**, 783288.
- Pujol-Buxó, E., Montori, A., Campeny, R., & Llorente, G. (2017). Observations on the intraspecific variation in tadpole morphology in natural ponds. *Acta Herpetologica*, **12**, 193–197.
- Pujol-Buxó, E., Kaliontzopoulou, A., Unanue-Goikoetxea, G., Ambrós, B., & Llorente, G.A. (2020). Geographical differences in competitive hierarchy in a native-invasive system. *Biological Journal of the Linnean Society*, **131**(3), 632–646.
- Rafinska, 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**(3), 197–210.
- Regueira, E., O'Donohoe, M.A., Pavon Novarin, M., Michou Etcheverria, G.C., Tropea, C., & Hermida, G.N. (2022). Integrating morphology and physiology of the key endocrine organ during tadpole development: The interrenal gland. *Journal of Anatomy*, **241**(6), 1357–1370.
- Rehncrona, S., Smith, D.S., Akesson, B., Westerberg, E., & Siesjö, B.K., (1980). Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺ and ascorbic acid stimulated lipid peroxidation in vitro. *Journal of Neurochemistry*, **34**, 1630–1638.
- Reznick, D.N. (1990). Plasticity in age and size at maturity in male guppies (*Poecilia reticulata*)- an experimental evaluation of alternative models of development. *Journal of Evolutionary Biology*, **3**, 185–203.
- Reyer, H.U., & Barandun, J. (1997). Reproductive ecology of *Bombina variegata*: characterisation of spawning ponds. *Amphibia - Reptilia*, **18**(2), 143–154.
- Relyea, R.A. (2001). The lasting effects of adaptive plasticity: predator-induced tadpoles become long-legged frogs. *Ecology*, **82**, 1947–1955.
- Relyea, R.A., & Hoverman J.T. (2003). The impact of larval predators and competitors on the morphology and fitness of juvenile treefrogs. *Oecologia*, **134**, 596–604.
- Relyea, R.A., & Auld, J.R. (2004). Having the guts to compete: how intestinal plasticity explains costs of inducible defences. *Ecology Letters*, **7**(9), 869–875.
- Richter-Boix, A., Llorente, G.A., & Montori, A. (2006a). Effects of phenotypic plasticity on post-metamorphic traits during pre-metamorphic stages in the anuran *Pelodytes punctatus*. *Evolutionary Ecology Research*, **8**(2), 309–320.
- Richter-Boix, A., Llorente, G.A., Montori, A. (2006b): A comparative analysis of the adaptive developmental plasticity hypothesis in six Mediterranean anuran species along a pond permanency gradient. *Evolutionary Ecology Research*, **8**, 1139–1154.

- Richter-Boix, A., Tejedo, M., & Rezende, E.L. (2011). Evolution and plasticity of anuran larval development in response to desiccation. A comparative analysis. *Ecology and Evolution*, **1(1)**, 15–25.
- Roff, D.A. (1980). Optimizing development time in a seasonal environment – the ups and downs of clinal variation. *Oecologia*, **45**, 202–208.
- 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*.
- Rohlf, F.J., & Slice, D. (1990). Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology*, **39**, 40–59.
- Rowe, L., & Ludwig, D. (1991). Size and timing of metamorphosis in complex life cycles: time constraints and variation. *Ecology*, **72**, 413–427.
- Rudolf, V.H., & Rödel, M.O. (2007). Phenotypic plasticity and optimal timing of metamorphosis under uncertain time constraints. *Evolutionary Ecology*, **21**, 121–142.
- Ruthsatz, K., Dausmann, K.H., Drees, C., Becker, L.I., Hartmann, L., Reese, J., Sabatino, N.M., Peck, M.A., & Glos, J. (2018). Altered thyroid hormone levels affect body condition at metamorphosis in larvae of *Xenopus laevis*. *Journal of Applied Toxicology*, **38(11)**, 1416–1425.
- Ruthsatz, K., Eterovick, P.C., Bartels, F., & Mausbach, J. (2023a). Contributions of water-borne corticosterone as one non-invasive biomarker in assessing nitrate pollution stress in tadpoles of *Rana temporaria*. *General and Comparative Endocrinology*, **331**, 114164.
- Ruthsatz, K., Rico - Millan, R., Eterovick, P.C., & Gómez Mestre, I. (2023b). Exploring water-borne corticosterone collection as a non-invasive tool in amphibian conservation physiology: Benefits, limitations and future perspectives. *Conservation Physiology*, **11(1)**, coad070.
- Saeki, Y., Tuda, M., & Crowley, P.H. (2014). Allocation trade-offs and life histories: a conceptual and graphical framework. *Oikos*, **123(7)**, 786–793.
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M., & Wall, D.H. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, **287(5459)**, 1770–1774.
- Schlichting, C.D., Pigliucci, M. (1998). Phenotypic evolution: a reaction norm perspective. In: Schlichting, C.D., Pigliucci, M. (Eds.), Phenotypic evolution: a reaction norm perspective. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Semlitsch, R.D., Scott, D.E., & Pechmann, J.H. (1988). Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology*, **69(1)**, 184–192.
- Semlitsch, R.D., & Reyer, H.U. (1992). Performance of tadpoles from the hybridogenetic *Rana esculenta complex*: Interactions with pond drying and interspecific competition. *Evolution*, **46(3)**, 665–676.
- Sheets, H.D. (2000). Integrated morphometrics package (IMP).
- 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 and evolution*, **1**, 1385.

- Shingleton, A.W., Frankino, W.A., Flatt, T., Nijhout, H.F., Emlen, D.J. (2007). Size and shape: the developmental regulation of static allometry in insects. *BioEssays*, **29**, 536–548.
- Sies, H., Cadenas, E., Symons, M.C.R., & Scott, G. (1985). Oxidative stress: Damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **311(1152)**, 617–631.
- Simonović, P., Tomović, Lj., Radojičić, J., Krizmanić, I., & Marić, S. (2004). Sistematika Vertebrata: praktikum. *NNK International*, Beograd.
- Sinsch, U., Leus, F., Sonntag, M., & Hantzschmann, A.M. (2020). Carry-over effects of the larval environment on the post-metamorphic performance of *Bombina variegata* (Amphibia, Anura). *Herpetological Journal*, **30(3)**.
- Smith-Gill, S.J., & Berven, K.A. (1979). Predicting amphibian metamorphosis. *American Naturalist*, **113**, 563–585.
- Speybroeck, J., Beukema, W., Bok, B., & Der Voort, J.V. (2016). Field guide to the amphibians and reptiles of Britain and Europe. *Bloomsbury Wildlife*, London, UK, 320.
- Spieler, M. (2000). Developmental plasticity and behavioural adaptations of two West African anurans living in an unpredictable environment (Amphibia, Anura). *Bonner zoologische Monographien*, **46**, 109–120.
- Spieler, M. (2003). Risk of predation affects aggregation size: a study with tadpoles of *Phrynomantis microps* (Anura: Microhylidae). *Animal behaviour*, **65(1)**, 179–184.
- StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (Data Analysis Software System), Version 10. <http://www.statsoft.com>
- Stearns, S.C. (1989). The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *Bioscience*, **39(7)**, 436–445.
- Stearns, S.C. (1992). The evolution of life histories. *Oxford University Press, Oxford, UK*.
- Stearns, S.C., & Kawecki, T.J. (1994). Fitness sensitivity and the canalization of life-history traits. *Evolution*, **48(5)**, 1438–1450.
- Stojković, B., & Tucić, N. (2012). Od molekula do organizma: molekularna i fenotipska evolucija. *Službeni glasnik, Beograd*.
- Stoler, A.B., & Relyea, R.A. (2013). Leaf litter quality induces morphological and developmental changes in larval amphibians. *Ecology*, **94(7)**, 1594–1603.
- Strauss, R.E., Altig, R. (1992). Ontogenetic body form changes in three ecological morphotypes of anuran tadpoles. *Growth, Development and Aging*, **56**, 3–16.
- Strong, R., Martin, F.L., Jones, K.C., Shore, R.F., & Halsall, C.J. (2017). Subtle effects of environmental stress observed in the early life stages of the Common frog, *Rana temporaria*. *Scientific reports*, **7**, 44438.
- Sultan, S.E. (1987). Evolutionary implications of phenotypic plasticity in plants. *Evolutionary biology*, **21**, 127–178.
- Székely, D., Denoël, M., Székely, P., & Cogălniceanu, D. (2017). Pond drying cues and their effects on growth and metamorphosis in a fast developing amphibian. *Journal of Zoology*, **303(2)**, 129–135.

- Székely, D., Cogălniceanu, D., Székely, P., Armijos-Ojeda, D., Espinosa-Mogrovejo, V., & Denoël, M. (2020). How to recover from a bad start: size at metamorphosis affects growth and survival in a tropical amphibian. *BMC ecology*, **20(1)**, 1–8.
- Sztatecsny, M., & Schabetsberger, R. (2005). Into thin air: vertical migration, body condition, and quality of terrestrial habitats of alpine common toads, *Bufo bufo*. *Canadian Journal of Zoology*, **83**, 788–796.
- Szymura, J.M. (1993). Analysis of hybrid zones with *Bombina*. *Hybrid zones and the evolutionary process*, 261–289.
- Takahashi, K.H. (2019). Multiple modes of canalization: Links between genetic, environmental canalizations and developmental stability, and their trait-specificity. *Seminars in cell and developmental biology*, **88**, 14–20.
- Tamura, M., Oshino, N., & Chance, B., (1982). Some characteristics of hydrogen- and alkylhydroperoxides metabolizing systems in cardiac tissue. *Journal of Biochemistry*, **92**, 1019–1031.
- Tejedo, M., Semlitsch, R.D., & Hotz, H. (2000). Covariation of morphology and jumping performance in newly metamorphosed water frogs: effects of larval growth history. *Copeia*, **2000**, 448–458.
- Tejedo, M., Marangoni, F., Pertoldi, C., Richter-Boix, A., Laurila, A., Orizaola, G., Nicieza, A.G., Alvarez, D., & Gómez Mestre, I. (2010). Contrasting effects of environmental factors during larval stage on morphological plasticity in post-metamorphic frogs. *Climate research*, **43(1-2)**, 31–39.
- Therond, P. (2006). Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA). *Annales pharmaceutiques francaises*, **64**, 383–389.
- Touchon, J.C., McCoy, M.W., Landberg, T., Vonesh, J.R., & Warkentin, K.M. (2015). Putting μ/g in a new light: plasticity in life history switch points reflects fine-scale adaptive responses. *Ecology*, **96(8)**, 2192–2202.
- Townsend, D.S., & Stewart, M.M. (1985). Direct development in *Eleutherodactylus coqui* (Anura: Leptodactylidae): a staging table. *Copeia*, **1985**, 423–436.
- Travis, J. (1984). Anuran size at metamorphosis: experimental test of a model based on intraspecific competition. *Ecology*, **65**, 1155–1160.
- Tucić, N. (2003). Evolucionarna biologija. *NNK International, Beograd, Srbija*.
- Tucić, N., & Tucić, B. (2000). Prirodna selekcija i adaptacije. *NNK International, Beograd, Srbija*.
- Urban, M.C. (2015). Accelerating extinction risk from climate change. *Science*, **348(6234)**, 571–573.
- Van Buskirk, J. (2009). Natural variation in morphology of larval amphibians: Phenotypic plasticity in nature? *Ecological Monographs*, **79**, 681–705.
- Van Buskirk, J., & Relyea, R.A. (1998). Selection for phenotypic plasticity in *Rana sylvatica* tadpoles. *Biological Journal of the Linnean Society*, **65(3)**, 301–328.
- Van Buskirk, J., & Saxer, G. (2001). Delayed costs of an induced defense in tadpoles? Morphology, hopping, and development rate at metamorphosis. *Evolution*, **55**, 821–829.

- Van Buskirk, J., & Steiner, U.K. (2009). The fitness costs of developmental canalization and plasticity. *Journal of evolutionary biology*, **22(4)**, 852–860.
- Van Kleunen, M., & Fischer, M. (2005). Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist*, **166**, 49–60.
- Via, S., & Lande, R. (1987). Evolution of genetic variability in a spatially heterogeneous environment: effects of genotype-environment interaction. *Genetics Research*, **49**, 147–156.
- Vukov, T., Kalezić, M.L., Tomović, Lj., Krizmanić, I., Jović, D., Labus, N., & Džukić, G. (2013): Amphibians in Serbia: distribution and diversity patterns. *Bulletin of the Natural History Museum*, **(6)**, 90–112.
- Waddington, C.H. (1942). Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, **150(3811)**, 563–565.
- Waddington, C.H. (1953). Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution*, 118–126.
- Waddington, C.H. (1961). Genetic assimilation. *Advances in genetics*, **10**, 257–293.
- Walsh, P.T., Downie, J.R., & Monaghan, P. (2008). Plasticity of the duration of metamorphosis in the African clawed toad. *Journal of Zoology*, **274(2)**, 143–149.
- Walton, M. (1988). Relationships among metabolic, locomotory, and field measures of organismal performance in the Fowler's toad (*Bufo woodhousei fowleri*). *Physiological Zoology*, **61(2)**, 107–118.
- Ward-Fear, G., Brown, G.P., & Shine, R. (2010). Factors affecting the vulnerability of cane toads (*Bufo marinus*) to predation by ants. *Biological Journal of the Linnean Society*, **99(4)**, 738–751.
- Warton, D.I., Wright, I.J., Falster, D.S., Westoby, M. (2006). Bivariate line-fitting methods for allometry. *Biological Review*, **81**, 259–291.
- Watkins, T.B. (2001). A quantitative genetic test of adaptive decoupling across metamorphosis for locomotor and life-history traits in the Pacific tree frog, *Hyla regilla*. *Evolution*, **55**, 1668–1677.
- Werner, E.E. (1986). Amphibian metamorphosis: growth rate, predation risk, and the optimal size at transformation. *The American Naturalist*, **128(3)**, 319–341.
- West-Eberhard, M.J. (2003). Developmental plasticity and evolution. *Oxford University Press*.
- Wilbur, H.M. (1980). Complex life-cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **11**, 67–93.
- Wilbur, H.M., & Collins, J.P. (1973). Ecological Aspects of Amphibian Metamorphosis: Non-normal distributions of competitive ability reflect selection for facultative metamorphosis. *Science*, **182(4119)**, 1305–1314.
- Wright, M.L., Richardson, S.E., & Bigos, J.M. (2011). The fat body of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles during metamorphosis: changes in mass, histology, and melatonin content and effect of food deprivation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, **160(4)**, 498–503.
- Zhu, W., Chang, L., Shu, G., Wang, B., & Jiang, J.P. (2021). Fatter or stronger: resource allocation strategy and the underlying metabolic mechanisms in amphibian tadpoles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, **38**, 100825.

8. PRILOZI

PRILOG 1. Mišljenje Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ za sprovođenje eksperimenta br. 1.



ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОШКА ИСТРАЖИВАЊА
"СИНИША СТАНКОВИЋ"
Број... 01-1066
Датум... 13.05.2019 год
БЕОГРАД Бул. деспота Стефана бр 142

Rešenje broj: 04-5/19

Veza: 01-1066 (09.05.2019)

ЕТИЧКА КОМИСИЈА

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Etička komisija IBISS razmotrila je zahtev o davanju mišljenja za upotrebu eksperimentalnih životinja (žutotrbi mukač) za potrebe istraživanja vezanih za izradu doktorske disertacije doktoranda Ane Kijanović. Istraživanjima rukovodi dr Nataša Tomašević-Kolarov, naučni saradnik IBISS. Istraživanja pod naslovom: „Fenotipska plastičnost žutotrbog mukača (*Bombina variegata*) u uslovima isušivanja staništa“ realizovaće se 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 15 mužjaka *Bombina variegata* i 15 ženki *Bombina variegata* (adulti) u eksperimentu koji će se realizovati od aprila do jula 2019. godine.

U Beogradu, 13.05.2019.

Predsednik Etičke komisije

dr Ivana Bjelobaba

PRILOG 2. Rešenje Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede za sprovođenje eksperimenta br. 2.



Република Србија
МИНИСТАРСТВО ПОЉОПРИВРЕДЕ,
ШУМАРСТВА И ВОДОПРИВРЕДЕ
Управа за ветерину
Број: 323-07-08393/2020-05/4
Датум: 05.08.2020. године
Београд

ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОШКА ИСТРАЖИВАЊА
„СИНИША СТАНКОВИЋ“
БЕОГРАД

Примљено: 10.08.2020.			
Орг. јед.	Број	Примок	Бредн.
03	246		

Министарство пољопрivreде, шумарства и водопрivreде - Управа за ветерину, на основу члана 34. Закона о добробити животиња („Службени гласник РС“ број 41/09), члана 136. Закона о општем управном поступку („Службени гласник РС“ број 26/2018 и 95/18 - аутентично тумачење), члана 23. став 2. Закона о државној управи („Службени гласник РС“ број 79/05 и 101/07, 95/2010 и 99/2014, 47/18 и 30/18 и други закон) и Решења о овлашћењу министра пољопрivreде, шумарства и водопрivreде Републике Србије бр:119-01-5/14/2017-09 од 30.06.2017. године, решавајући по захтеву Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић", ул. Булевар Деспота Стефана 142, Београд, за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама. директор Управе за ветерину, Емина Милакара, доноси:

РЕШЕЊЕ

УСВАЈА СЕ захтев Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић", ул. Булевар Деспота Стефана 142, Београд и издаје се Решење о одобрењу спровођења огледа на животињама, под називом:

"Фенотипска пластичност житотрбог мукача (*Bombina variegata*) у словима исушивања станишта".

Образложење

Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић", ул. Булевар Деспота Стефана 142, Београд обратио се овом министарству, дана 31.07.2020. године, захтевом за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, под називом: "Фенотипска пластичност житотрбог мукача (*Bombina variegata*) у словима исушивања станишта".

Подносилац пријаве је Министарству, уз захтев, доставио и документацију прописану Законом о добробити животиња („Службени гласник РС“ број 41/09) и Правилником о условима за упис у регистар за огледе на животињама и садржини и начину вођења тог Регистра, програму обуке о добробити огледних животиња, обрасцу захтева за одобрење спровођења огледа на животињама, начину неге, поступања и лишавању живота огледних животиња, као и садржини и начину вођења евиденције о држању, репродукцији, промету, односно спровођењу огледа на животињама ("Службени гласник РС", бр. 39/10) и то: податке о називу и седишту правно лица, попуњен захтев за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, стручно мишљење Етичке комисије о спровођењу предметног огледа, Решење о упису у Регистар за огледе на животињама.

PRILOG 2. Nastavak.

Поред тога, подносилац захтева је поднео и Дозволу за истраживање строго заштићених и заштићених дивљих врста у научноистраживачке сврхе, издату од стране Министарства заштите животне средине, бр. 353-01-2876/2019-04, од дана 14.02.2020. године.

Приликом решавања по захтеву, увидом у приложену документацију, утврђено је да су стекли услови за доношење решења, као у диспозитиву, сходно одредбама члана 136. Закона о општем управном поступку („Службени гласник РС“ број 26/2018 и 95/18 - аутентично тумачење).

Упутство о правном средству:

Ово решење је коначно у управном поступку. Против овог решења се може покренути управни спор, подношењем тужбе Управном суду Србије, у року од 30 дана од дана пријема решења.

в.д. ДИРЕКТОР

Емина Милакара

Доставити:

1. Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић", Булевар Деспота Стефана 142, 11060 Београд
2. Реп. ветеринарска инспекција, Велислава Вуловића 1А/4, 11000 Београд
3. Евиденција
4. Архива

PRILOG 3. Rešenje Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede za sprovođenje eksperimenta br. 3.



Република Србија
МИНИСТАРСТВО ПОЉОПРИВРЕДЕ,
ШУМАРСТВА И ВОДОПРИВРЕДЕ
Управа за ветерину
Број: 323-07-03971/2021-05
Датум: 19.04.2021. године
Београд

ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОШКА ИСТРАЖИВАЊА
„СИНИША СТАНКОВИЋ“

Примљено: 22.4.2021.			
Органи:	Број:	Датум:	Зре:
03	103		

Министарство пољопрivreде, шумарства и водопрivreде - Управа за ветерину, на основу члана 34. Закона о добробити животиња („Службени гласник РС“ број 41/09), члана 136. Закона о општем управном поступку („Службени гласник РС“ број 26/2018 и 95/18 - аутентично тумачење), члана 23. став 2. Закона о државној управи („Службени гласник РС“ број 79/05 и 101/07, 95/2010 и 99/2014, 47/18 и 30/18 и други закон) и Решења о овлашћењу министра пољопрivreде, шумарства и водопрivreде Републике Србије бр: 119-01-4/11/2020-09 од 28.10.2020. године, решавајући по захтеву Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић", ул. Булевар Деспота Стефана 142, Београд, за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама. директор Управе за ветерину, Емина Милакара, доноси:

РЕШЕЊЕ

УСВАЈА СЕ захтев Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић", ул. Булевар Деспота Стефана 142, Београд и издаје се Решење о одобрењу спровођења огледа на животињама, под називом:

"Испитивање фенотипске пластичности жутотрбог мукача (*Bombina variegata*, *Bombinatoridae*, *Anura*, *Amphibia*) изазваног исушивањем воденог станишта: утицај кортикостерона и његовог инхибитора метирапона".

Образложење

Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић", ул. Булевар Деспота Стефана 142, Београд обратио се овом министарству, дана 15.04.2021. године, захтевом за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, под називом: "Испитивање фенотипске пластичности жутотрбог мукача (*Bombina variegata*, *Bombinatoridae*, *Anura*, *Amphibia*) изазваног исушивањем воденог станишта: утицај кортикостерона и његовог инхибитора метирапона".

Подносилац пријаве је Министарству, уз захтев, доставио и документацију прописану Законом о добробити животиња („Службени гласник РС“ број 41/09) и Правилником о условима за упис у регистар за огледе на животињама и садржини и начину вођења тог Регистра, програму обуке о добробити огледних животиња, обрасцу захтева за одобрење спровођења огледа на животињама, начину неге, поступања и лишавању живота огледних животиња, као и садржини и начину вођења евиденције о држању, репродукцији, промету, односно спровођењу огледа на животињама ("Службени гласник РС", бр. 39/10) и то: податке о називу и седишту правног лица, допуњен захтев за издавање Решења о одобрењу спровођења огледа на животињама, стручно

PRILOG 3. Nastavak.

мишљење Етичке комисије о спровођењу предметног огледа, бр. 01-35, од дана 05.04.2021. године, Решење о упису у Регистар за огледе на животињама.

Приликом решавања по захтеву, увидом у приложену документацију, утврђено је да су стекли услови за доношење решења, као у диспозитиву, сходно одредбама члана 136. Закона о општем управном поступку („Службени гласник РС" број 26/2018 и 95/18 - аутентично тумачење).

Упутство о правном средству:

Ово решење је коначно у управном поступку. Против овог решења се може покренути управни спор, подношењем тужбе Управном суду Србије, у року од 30 дана од дана пријема решења.



в.д. ДИРЕКТОР

Емина Милакара
Емина Милакара

Доставити:

1. Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић", Булевар Деспота Стефана 142, 11060 Београд
2. Реп. ветеринарска инспекција, Велислава Вуловића 1А/4, 11000 Београд
3. Евиденција
4. Архива

BIOGRAFIJA AUTORA

Ana I. Radmilović, rođena Kijanović, se rodila 28. jula 1994. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2013/2014. godine, na studijskoj grupi Biologija. Osnovne akademske studije završila je 2017. godine. Iste godine je upisala master studije biologije. Master rad pod nazivom „Polni dimorfizam u dužini prstiju i njihovim odnosima kod više vrsta porodice Salamandridae“ odbranila je 2018. godine pod mentorstvom Dr Nataše Tomašević Kolarov, naučnog savetnika Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. U toku master studija Ana je radila 4 meseca kao nastavnica biologije u osnovnoj i srednjoj školi. Školske 2018/2019. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biologija, modul Zoologija. Eksperimentalni deo doktorske teze urađen je u okviru odeljenja za Evolucionu biologiju pod mentorstvom Dr Nataše Tomašević Kolarov, naučnog savetnika Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Od 2019. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za Evolucionu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Od 2020. godine saraduje sa Regionalnim centrom za talente i priprema nadarene učenike za takmičenje iz biologije. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 2021. godine.

Ana Radmilović je do sada objavila 12 bibliografskih jedinica: 9 radova u časopisima međunarodnog značaja i 3 kongresna saopštenja na skupovima međunarodnog značaja.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ана Радмиловић

Број индекса Б3008/2018

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Фенотипска пластичност жутотрбог мукача (*Bombina variegata*) у условима исушивања станишта“

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана Радмиловић

Број индекса Б3008/2018

Студијски програм Биологија

Наслов рада „Фенотипска пластичност жутогробог мукача

(*Bombina variegata*) у условима исушивања станишта“

Ментори др Наташа Томашевић Коларов

др Имре Кризманић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

„Фенотипска пластичност жутотрбог мукача (*Bombina variegata*) у условима исушивања станишта“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.