

**Univerzitet u Beogradu  
Biološki fakultet**

**Milena Cvijanović**

**Evolucija velikih mrmoljaka, *Triturus  
cristatus* superspecies (Salamandridae,  
Caudata): odlike životne istorije i ontogenija  
oblika**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2010.**



Univerzitet u Beogradu  
Biološki fakultet

Milena Cvijanović

**Evolucija velikih mrmoljaka, *Triturus cristatus* superspecies  
(Salamandridae, Caudata): odlike životne istorije i ontogenija  
oblika**

Mentor:

dr Ana Ivanović, vanredni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Miloš Kalezić, redovni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Georg Džukić, naučni savetnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

dr Ljiljana Tomović, docent  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Naslovna strana: *Triturus dobrogicus*, fotografija dr Tanja Vukov

Doktorska disertacija  
Beograd, 2010.

# SADRŽAJ

<b>Sadržaj</b>	<b>I</b>
<b>Zahvalnica</b>	<b>III</b>
<b>Indeks slika</b>	<b>IV</b>
<b>Indeks tabela</b>	<b>VIII</b>
<b>1. UVOD I CILJEVI STUDIJE</b>	<b>1</b>
1.1. Opšti uvod	1
1.2. Vrste evropskih mrmoljaka ( <i>Triturus</i> , Amphibia, Salamandridae)	4
• <i>Biologija vrste i odlike životne istorije velikih     mrmoljaka</i>	6
• <i>Filogenetski odnosi i karakteristike analiziranih     vrsta</i>	8
1.3. Evolucionni aspekti životnih istorija	9
1.4. Ciljevi studije	15
<b>2. MATERIJAL I METODE</b>	<b>17</b>
2.1. Pregled analiziranih uzoraka populacija mrmoljaka	17
2.2. Dizajn eksperimenta	19
2.3. Analize	21
2.3.1. Karakteristike jaja	21
2.3.2. Embrionsko razviće	23
2.3.3. Stopa rasta larvi	26
2.3.4. Ontogenija oblika tela	27

<b>3. REZULTATI I DISKUSIJA</b>	<b>33</b>
3.1. Poglavlje I: <b>Karakteristike jaja</b>	<b>34</b>
• <i>Species-specifični odnosi veličine vitelusa i galertnog omotača kod velikih mrmoljaka</i>	<b>38</b>
3.2. Poglavlje II: <b>Embrionsko razviće</b>	<b>41</b>
• <i>Različiti obrasci međusobnih odnosa osobina rane životne istorije i embrionskog razvića velikih mrmoljaka</i>	<b>50</b>
3.3. Poglavlje III: <b>Stopa rasta larvi</b>	<b>52</b>
• <i>Različite stope rasta larvi i dužine larvenog perioda kao adaptacije na tipove staništa</i>	<b>56</b>
3.4. Poglavlje IV: <b>Ontogenija oblika tela larvi</b>	<b>58</b>
• <i>Species-specifičan oblik larvi i „juvenilni filotipski period“</i>	<b>66</b>
3.5. Poglavlje V: <b>Filogenija osobina životne istorije</b>	<b>69</b>
<b>4. ZAKLJUČCI</b>	<b>76</b>
<b>5. LITERATURA</b>	<b>78</b>
<b>6. PRILOG I</b>	<b>94</b>
<b>7. PRILOG II</b>	<b>104</b>

## ZAHVALNICA

*Veliko hvala dr Ani Ivanović što je bila uvek uz mene u svakom trenutku rada na ovoj tezi. Sreća je imati sjajnog mentora pa i uzora u naučnom svetu (kao i u porodičnom životu). Takođe veliko hvala dr Georgu Džukiću i prof. dr Milošu Kaleziću za uvođenje u svet herpetologije i nauke kao i na beskrajnom poverenju tokom rada na ovoj tezi. Hvala i dr Ljiljani Tomović za podršku i savetovanje oko izrade teze.*

*Veliko hvala i mojim projekatskim kolegicama i sada ličnim prijateljima: dr Katarini Ljubisavljević za pomoć u prevazilaženju teških trenutaka svojim savetima i iskustvom, dr Tanji Vukov za pokazivanje „zle” statistike i svega ostalog što jednu osobu čini dobrim asistentom na radu, mr Nataši Tomašević Kolarov za nesebičnu pomoć na eksperimentu iako su u pitanju bili i po malo ekstremni uslovi.*

*Hvala i drugarima sa odeljenja: Ani, Darki, Nataši, Danijeli i Stevi na divnoj atmosferi i „čašicama” razgovora.*

*Najviše hvala mojoj porodici: mojoj sestri Vladislavi što me je „naterala” ovim da se bavim (i dalje važi obećanje da ćeš da me izdržavaš), mom starijem bati Mladenu na onim ćušcima u čitaonici i što me je naučio šta završava fakultet i naravno mojim roditeljima što su u mene ulagali i materijalno i mentalno. Ova teza je i vaš uspeh!*

*Hvala puno i mom mužu Gorčinu za beskrajno razumevanje tokom rada na eksperimentu (zaista sam bila na poslu vikendom) i što si me podržavao i kao naučnog radnika, sportistu pa i domaćicu. Bez tebe ne bih stigla da budem ništa od toga.*

*I naravno hvala mojoj ćerci Mili što mi je „sela na kičmu” da završim ovu tezu.*

## INDEKS SLIKA

### Poglavlje Uvod i ciljevi studije

- Slika 1.2.1. Distribucija mrmoljaka roda *Triturus* (prema Espregueira Themudo i sar., 2009., modificirano) 6
- Slika 1.2.2. Filogenetski odnosi analiziranih vrsta velikih mrmoljaka sa vrstom *T. marmoratus* kao vangrupnim taksonom prema Espregueira Themudo i sar. 2009.:  
a) bazirano na sekvencama dva mitohondrijska i pet nuklearnih gena, modificirano i b) bazirano na pet nuklearnih gena, modificirano. 8
- Slika 1.2.3. Filogenetski odnosi analiziranih vrsta velikih mrmoljaka na osnovu filogenetskog stabla za rod *Triturus* dobijenog analizama DNK sekvenci iz dva mitohondrijska i pet nuklearnih gena (iz Espregueira Themudo i sar., 2009) sa pregledom njihovih morfoloških i ekoloških karakteristika: VT – veličina tela (Arntzen i Wallis, 1999); BM – broj meseci provedenih u vodi godišnje (Arntzen, 2003); TVS – tip vodenog staništa (Arntzen, 2003); BP – broj pršljena (Lanza i sar. , 2010). 9
- Slika 1.3.1. Shema evolucione kauzalnosti (po Stearns, 1992) 11
- Slika 1.3.2. Shematski prikaz dva različita životna ciklusa. Puna linija predstavlja „zaštićeni stadijum“, dok isprekidana linija predstavlja slobodno-živeći stadijum (iz Pechenik, 2001) 12

### Poglavlje Materijal i metode

- Slika 2.1.1. Analizirane vrste velikih mrmoljaka 17
- Slika 2.1.2. Pregled geografskog položaja lokaliteta analiziranih

populacija	18
Slika 2.2.1. Dizajn eksperimenta	20
Slika 2.3.4.1. Izbor tačaka i polu-specifičnih tačaka na lateralnom izgledu a) larvi od 75, 90 i 105 dana starosti i larvama u procesu metamorfoze i b) juvenilnih jedinki po metamorfozi: <b>1.</b> vrh njuške; <b>2.</b> centar oka; <b>3.</b> visina glave u nivou oka; <b>4.</b> početak dorzalnog repnog nabora; <b>5-12.</b> polu-specifične tačke koje predstavljaju oblik dorzalnog repnog nabora kod larvi i repa kod juvenilnih jedinki; <b>13.</b> vrh repa; <b>14.</b> položaj zadnjeg ekstremiteta i <b>15.</b> položaj prednjeg ekstremiteta.	29
<b>Poglavlje: Rezultati i diskusija</b>	
Slika 3.1.1. Morfotipovi, prosečne mere jaja i vreme provedeno u vodi godišnje za analizirane vrste velikih mrmoljaka.	40
Slika 3.2.1. Preživljavanje embriona analiziranih vrsta od trenutka polaganja jaja do izvaljivanja larvi.	42
Slika 3.2.2. Stadijumi razvića svih analiziranih vrsta velikih mrmoljaka na tri različita vremenska preseka tokom embrionskog razvića.	45
Slika 3.2.3. Shematski prikaz korelacionih matrica istraživanih odlika životne istorije i embrionalnog razvića za svaku analiziranu vrstu. Pune linije predstavljaju pozitivne korelacije, dok isprekidane linije predstavljaju negativne korelacije.	49
Slika 3.3.1. Stopa rasta larvi četiri analizirane vrste velikih mrmoljaka.	55
Slika 3.4.1. Položaj larvi starih 75 dana za četiri vrste velikih mrmoljaka u prostoru opisanom prve dve kanonijske ose. Promene oblika larvi opisane kanonijskim osama prikazane su deformacijama mreže.	60
Slika 3.4.2. Položaj larvi starih 90 dana za četiri vrste velikih mrmoljaka	

- u prostoru opisanom sa prve dve kanonijske ose. Promene oblika larvi opisane kanonijskim osama prikazane su deformacijama mreže. 61
- Slika 3.4.3. Položaj larvi starih 105 dana za četiri vrste velikih mrmoljaka u prostoru opisanom prve dve kanonijske ose. Promene oblika larvi opisane kanonijskim osama prikazane su deformacijama mreže. 62
- Slika 3.4.4. Odnos između stope ukupnih promena (Prokrustove distance) i veličine tela (CS) dobijen modelom II tipa regresije (SMA).  $b$  – regresioni nagib,  $r^2$  - koeficijent određivanja,  $i$   $p$  – statistička značajnost su dati za sve analizirane vrste. 64
- Slika 3.4.5. Totalna varijansa oblika tela na različitim periodima tokom ontogenije velikih mrmoljaka.  $m$  – larve tokom metamorfoze;  $j$  – juvenilne jedinke. 66
- Slika 3.5.1. Filogenetski odnosi analiziranih vrsta velikih mrmoljaka na osnovu filogenetskog stabla za rod *Triturus* dobijenog analizama DNK sekvenci iz dva mitohondrijska i pet nuklearnih gena (iz Espregueira Themudo i sar., 2009, modifikovano) sa pregledom dve odlike životne istorije. VJ – veličina jaja (zapremina vitelusa i galerte kao i njihov odnos); EP – dužina trajanja embrionalnog perioda. 71
- Slika 3.5.2. Filogenetski odnosi analiziranih vrsta velikih mrmoljaka na osnovu filogenetskog stabla za rod *Triturus* dobijenog analizama DNK sekvenci iz dva mitohondrijska i pet nuklearnih gena (iz Espregueira Themudo i sar., 2009, modifikovano) sa pregledom veličina njihovih tek izvaljenih larvi. 72
- Slika 3.5.3. Filogenetski odnosi analiziranih vrsta velikih mrmoljaka sa promenama oblika tela larvi kod larvi starosti 105 dana. Promene oblika larvi su prikazane deformacionim mrežama. 74



## **Poglavlje: Prilog I**

Slika 1.	Grafički prikaz zapremine galerte za analizirane vrste velikih mrmoljaka. Srednja vrednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrednosti.	98
Slika 2.	Grafički prikaz zapremine vitelusa za analizirane vrste velikih mrmoljaka. Srednja vrednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrednosti.	99
Slika 3.	Grafički prikaz odnosa zapremine vitelusa i galerte za analizirane vrste velikih mrmoljaka. Srednja vrednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrednosti.	100
Slika 4.	Grafički prikaz zapremine galerte za analizirane vrste velikih mrmoljaka po populacijama. Srednja vrednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrednosti.	101
Slika 5.	Grafički prikaz zapremine vitelusa za analizirane vrste velikih mrmoljaka po populacijama. Srednja vrednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrednosti.	102
Slika 6.	Grafički prikaz odnosa zapremine vitelusa i galerte za analizirane vrste velikih mrmoljaka po populacijama. Srednja vrednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrednosti.	103

## INDEKS TABELA

### Poglavlje: Materijal i metode

Tabela 2.3.1. Pregled vrsta i populacija koje su korišćene za analizu varijabilnosti u karakteristikama jaja.	22
---	----

### Poglavlje: Rezultati i diskusija

Tabela 3.1.1. Rezultati dvofaktorske analize varijansi za zapreminu vitelusa i odnosa zapremine galertnog omotača i vitelusa za analizirane vrste velikih mrmoljaka.	36
Tabela 3.1.2. Rezultati regresije između zapremine vitelusa i veličine ženki za sve analizirane vrste velikih mrmoljaka.	37
Tabela 3.1.3. Deskriptivna statistika mera jaja za četiri vrste analiziranih velikih mrmoljaka. N – broj jaja, SV – srednja vrednost, SD – standardna devijacija, CV – koeficijent varijacije.	38
Tabela 3.2.1. Stope preživljavanja (SR) i intervali poverenja stopa preživljavanja (CI) embriona analiziranih vrsta velikih mrmoljaka između svakog vremenskog intervala.	43
Tabela 3.2.2. Poređenje embrionskih stadijuma na svim vremenskim presecima (S7, S11 i S15) između vrsta. Statistički značajne razlike između vrsta su predstavljene debljim linijama.	44
Tabela 3.2.3. Srednje vrednosti (SV), standardne devijacije (SD) i koeficijenti variranja (CV) za analizirane rane odlike životne istorije velikih mrmoljaka za ukupan broj jaja odnosno larvi (N).	46
Tabela 3.2.4. Pirsonovi koeficijenti korelacija između 11 analiziranih odlika životne istorije i embrionalnog razvića velikih mrmoljaka: a) <i>T. macedonicus</i> , 91 kohorta (gornja	

dijagonala); <i>T. arntzeni</i> , 34 kohorte, (donja dijagonala); b) <i>T. cristatus</i> , 19 kohorti, (gornja dijagonala); <i>T. dobrogicus</i> , 76 kohorti, (donja dijagonala). Statistički značajni koeficijenti korelacije ( $p < 0.05$ ) su predstavljeni debljim brojevima. Skracenicice su objašnjene u delu Materijal i metode.	47
Tabela 3.2.5. Rezultati poređenja korelacionih matrica između vrsta. $R_{obs}$ – dobijeni koeficijent korelacije između matrica; $R_{max}$ – maksimalni koeficijent korelacije između dve matrice; $R_{adj}$ – korigovan koeficijent korelacije između dve matrice. Pouzdanost je testirana Mantel testom sa 10000 ponavljanja. Polazna hipoteza je da ne postoji sličnost između matrica koje se porede. Vrednosti sa zvezdicama ukazuju na sličnost matrice ( $p < 0.05$ ).	48
Tabela 3.3.1. Srednje vrednosti (SV), standardne devijacije (SD) totalnih dužina larvi različitih starosti za 4 vrste velikih mrmoljaka.	54
Tabela 3.3.2. Standardna dužina metamorfoziranih juvenilnih jedinki i trajanje larvenog perioda sa standardnim devijacijama i opsegom za analizirane <i>Triturus</i> vrste.	56
Tabela 3.4.1. Srednje vrednosti (SV) i standardne devijacije (SD) za meru veliĉine (CS) za ĉetiri vrste velikih mrmoljaka tokom njihove ontogenije. Razlike u veliĉinama između vrsta su testirane analizom varijanse (ANOVA).	59
Tabela 3.4.2. Rezultati multivarijantne analize kovarijanse varijabli oblika sa vrstom i varijablom veliĉine (CS) kao kovarijablama.	63
Tabela 3.4.3. Rezultati poređenja uzrasno specifiĉnih kovarijacionih matrica između ontogenetskih perioda. Sličnost matrica je testirana na osnovu 10000 ponavljanja.	65
Tabela 3.4.4. Rezultati poređenja uzrasno specifiĉnih kovarijacionih matrica između vrsta. Sličnost matrica je testirana na osnovu 10000 ponavljanja. <b>75</b> – 75 dana stare larve; <b>90</b> – 90 dana	

stare larve; **105** – 105 dana stare larve; **m** – larve tokom metamorfoze; **j** – juvenilne jedinke. 65

**Poglavlje: Prilog I**

Tabela 1. Deskriptivna statistika mera jaja za četiri vrste analiziranih velikih mrmoljaka po populacijama. *SV* – srednja vrednost, *SD* – standardna devijacija, *CV* – koeficijent varijacije. 95

Tabela 2. Deskriptivna statistika mera jaja za četiri vrste analiziranih velikih mrmoljaka po ženkama. *SV* – srednja vrednost, *SD* – standardna devijacija, *CV* – koeficijent varijacije. 96

# 1. UVOD I CILJEVI STUDIJE

“The synthesis of ecological, phylogenetic, experimental, and genomic advances promises to make the coming years a golden age for the study of adaptive radiation; natural history data, however, will always be crucial to understanding the forces shaping adaptation and evolutionary diversification”

(Jonathan B. Losos, 2010)

## 1.1. Opšti uvod

Mehanizmi, procesi, kao i ograničenja koja dovode do morfoloških promena i koja uslovljavaju pravac i brzinu morfoloških promena tokom evolucije, nalaze se u žiži interesovanja savremene evolucione morfologije. To se pre svega odnosi na promene tokom razvića (Richardson, 1999), na odnos ontogenije i filogenije (Alberch i sar., 1979; Klingenberg, 1998; Zelditch i sar., 2000), i na značaj filogenetskih ograničenja (Blomberg i sar., 2003). Pri tome, podaci o karakteristikama životne istorije su neophodni za sagledavanje mehanizama i procesa koji uslovljavaju adaptivnu radijaciju i dovode do diverzifikacije tokom evolucije (Stearns, 1989; Stearns, 1992; Roff, 2002). Zatim, tokom razvića oblik tela se kontinuirano menja i različitost u ontogenetskim putanjama promena oblika podrazumeva i niz razvojnih promena (Richardson, 1999). Tako istraživanje promena oblika tela tokom ontogenije je od posebnog značaja za razumevanje evolucione raznolikosti, tj. stope promena i opseg variranja morfoloških osobina. Takođe, istraživanja promena oblika tela pomažu boljem shvatanju adaptacija i raznih razvojnih ograničenja tokom rasta i razvića (Maier, 1999). Da bi se predvideli uzroci koji dovode do morfoloških promena tokom ontogenije (Hallgrímsson i sar., 2002; Hendrikse i sar., 2007), dva pravca

istraživanja se izdvajaju kao posebno važna. Prvi, obrazac ontogenetskih promena koji uključuje i poređenje ontogenetskih putanja vrsta koje se razlikuju u obliku (Alberch i sar., 1979; Klingenberg, 1998; Zelditch i sar., 2000), i drugi, obrasci variranja u različitim fazama ontogenetskih putanja (Zelditch i Caramichael, 1989; Badyaev i Martin, 2000; Hallgrímsson i sar., 2002, Fisher-Rousseau i sar., 2009). Tako se u ovoj tezi razmatraju dve grupe problema: evolucija odlika životne istorije i promene oblika tela tokom ontogenije velikih mrmoljaka.

Način na koji se resursi raspoređuju za rast, razviće i reprodukciju, takozvani „životni obrazac“, karakterišu životnu istoriju („life-history“) jedinke (Stearns 1976; Partridge i Harvey, 1988; Crawford i Anderson, 1989; Tucić 2003). Istraživanja životnih istorija, uključujući i njihovu evoluciju, uglavnom su fokusirana na istraživanje takozvanih „hard“ komponenti životnih istorija, tj. na fenotipske karakteristike na koje direktno utiče selekcija i koje se mogu lako posmatrati, kvantifikovati i povezati direktno sa adaptivnom vrednošću (Resetarits, 1996). Kao glavne komponente životne istorije mogu se izdvojiti: 1. veličina tela pri rođenju, 2. model rasta, 3. starost pri dostizanju polne zrelosti, 4. veličina tela pri dostizanju polne zrelosti, 5. broj, veličina i odnos polova potomaka, 6. uzrasno specifična reproduktivna ulaganja, 7. uzrasno specifičan mortalitet, i 8. dužina života (Stearns, 1992). Teorija i istraživanja odlika životnih istorija bave se pitanjima kao što su: šta određuje i uslovljava (1) veličinu tela, (2) vreme dostizanja polne zrelosti i vreme reprodukcije, (3) broj potomaka, (4) dužinu života pojedinih grupa (Stearns, 2000). Dakle, istraživanja životnih istorija imaju za cilj da utvrde procese i mehanizme koji dovode do variranja u veličinama tela pri rođenju, u stopama rasta, starosti i veličini pri dostizanju polne zrelosti, reproduktivnom ulaganju, veličini legla, dužini života i stopi mortaliteta (Stearns, 1992; Roff, 2002). Organizmi na mnogo različitih načina „kombinuju“ komponente životnih istorija i tako utiču na adaptivne vrednosti jedinki (Stearns, 1992). Takođe, odlike životnih istorija su međusobno povezane i uslovljene kroz „uzajamna ograničenja“ (engl. *trade off*). (npr. veza između reprodukcije i preživljavanja, veza između reprodukcije i budućeg ulaganja u reprodukciju,

odnos između broja i veličine potomaka, itd (Stearns, 1989; Stearns, 1992; Roff, 2002)).

Kada su u pitanju istraživanja evolucije odlika životne istorije, od posebnog značaja je da se varijabilnost odlika životnih istorija analizira na grupi blisko srodnih vrsta sa poznatim filogenetskim odnosima, koje žive u različitim staništima, tj. koje su izložene različitom uticaju sredinskih faktora. Sa šest fenotipski izdvojenih taksona (Arntzen i Wallis, 1999; Ivanović i sar., 2008a, Ivanović i sar., 2008b), i sa u velikoj meri istraženim filogenetskim odnosima (e.g., Arntzen i sar., 2007; Espregueira Themudo i sar., 2009), grupa velikih mrmoljaka (*Triturus cristatus* superspecies) ispunjava prethodno navedene zahteve. Ono što velike mrmoljke čini posebno interesantnim model organizmima u evolucionim istraživanjima je i obrazac variranja čitavog niza fenotipskih karakteristika. U okviru ove filogenetske klade, obrazac variranja u obliku i veličini tela (Arntzen i Wallis, 1999), broju pršljena (Crnobrnja-Isailović i sar., 1997; Arntzen i Wallis, 1999, Lanza i sar., 2010), obliku lobanje (Ivanović i sar., 2008a), skeletu ekstremiteta (Ivanović i sar., 2008b), i veličini mozga (Vukov i sar., 2007), u velikoj meri prati za vrste specifične ekološke faktore (npr. određen tip vodenih staništa, optimalna temperatura, vreme provedeno u vodi tokom reprodukcije). Zato evroazijski mrmoljci roda *Triturus* čine odličan model sistem za istraživanja u evolucionoj biologiji (Griffiths, 1996; Gvozdik i Van Damme, 2006; Arntzen i sar. 2007; Ivanović i sar. 2008a,b). Takođe, veliki mrmoljci, kao grupa sa složenim životnim ciklusom i sa tim u vezi različitim životnim sredinama koje naseljavaju, su važan model i za istraživanje promene oblika tela tokom ontogenije. Kod njih metamorfoza predstavlja ključnu morfološku transformaciju tokom ontogenije. Dakle, različita ograničenja izazvana različitim ekološkim zahtevima mogu da utiču na ontogenetske putanje i promene oblika tela tokom razvića (Bishop i sar., 2006; Strauss i Altig, 1992; Fisher-Rousseau i sar., 2009).

Rod *Triturus* Rafinesque, 1815 (Amphibia, Caudata, *Salamandridae*) naseljava gotovo čitavu Evropu i susedne delove Azije i čine ga šest vrsta velikih mrmoljaka (*T. dobrogicus*, *T. cristatus*, *T. karelinii*, *T. arntzeni*, *T. carnifex* i *T. macedonicus*) i dve vrste mramorastih velikih mrmoljaka (*T. marmoratus* i *T.*

*pygmeus*). Kao kod ostalih evropskih mrmoljaka, veliki mrmoljci se odlikuju postojanjem akvatičnog larvenog stupnja, metamorfozom i izraženim seksualnim dimorfizmom, posebno u epigamnim odlikama (Halliday, 1977).

## **1.2. Vrste evropskih mrmoljaka (*Triturus*, Amphibia, Salamandridae)**

Veliki mrmoljci pripadaju monofiletskoj porodici *Salamandridae* koja se odvojila od ostalih vodozemaca još pre oko 100 miliona godina, sa centrom postanka u Evropi (Milner 1983, Weisrock i sar. , 2005; Steinfartz i sar., 2007; Zhang i sar., 2008). Ova familija se odlikuje visokim taksonomskim diverzitetom (21 rod sa 81 vrstom sa holarktičkim rasprostranjenjem, prema najnovijim podacima sa AmphibiaWeb, <http://amphibiaweb.org>), kao i izraženim razlikama između rodova u odlikama morfologije, reproduktivnog ponašanja i načinu reprodukcije (Salthe, 1967). Najveći diverzitet je u Evropi. Među 21 rodom ove familije, rod *Triturus* ima najšire rasprostranjenje i sa većim je brojem vrsta u odnosu na ostale rodove.

Rod *Triturus* Rafinesque, 1815 (Amphibia, Caudata, *Salamandridae*) naseljava gotovo čitavu Evropu i susedne delove Azije. Prisutan je u celoj Evropi osim na severu Skandinavije i mediteranskim ostrvima (Steinfartz i sar., 2007). Do skoro je rod *Triturus* bio podeljen na 3 grupe:

1. grupu velikih mrmoljaka (ukupna dužina preko 16cm) kojoj pripadaju *Triturus carnifex*, *T. macedonicus*, *T. cristatus*, *T. karelinii*, *T. arntzeni*, *T. dobrogicus*, *T. marmoratus* i *T. pygmaeus*.
2. grupu mrmoljaka srednjih veličina (ukupna dužina oko 12cm): *T. alpestris* i *T. vittatus*.
3. grupa malih mrmoljaka (ukupna dužina oko 8cm), a to su *T. vulgaris*, *T. boscai*, *T. helveticus*, *T. montandoni* i *T. italicus*.

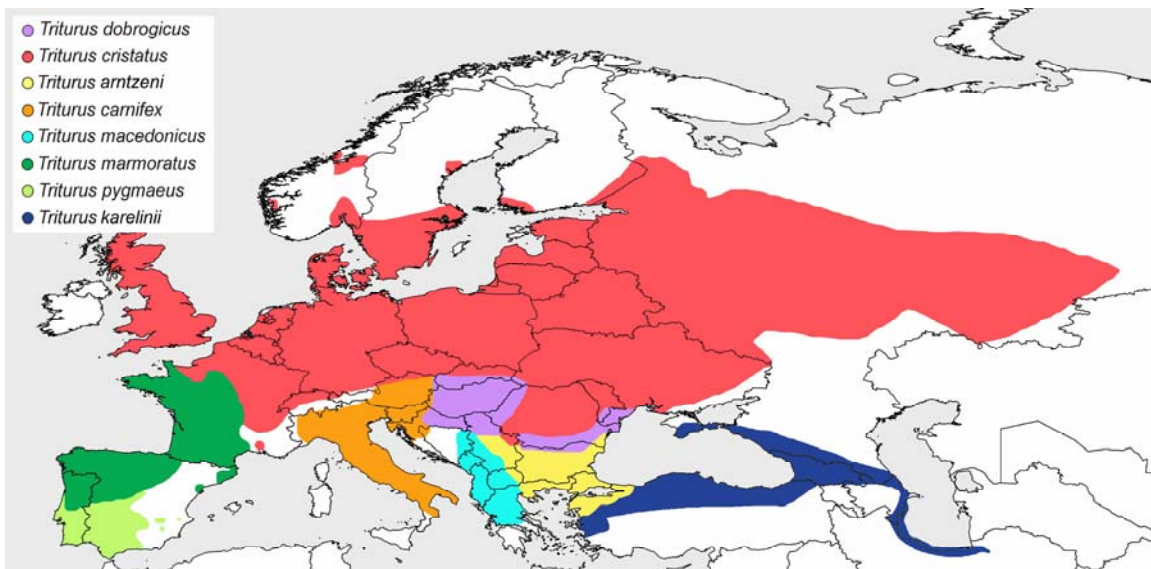
Međutim, noviji radovi na filogeniji ovog roda ukazuju na potrebu taksonomske revizije. Po jednoj grupi autora (Garcia-Paris i sar. , 2004), ovaj



rod je podeljen na 3 roda: rod *Triturus* (*sensu stricto*) koji uključuje sve velike mrmoljke i dve vrste mramorastih mrmoljaka (*T. marmoratus* i *T. pygmeus*) kao i *T. vittatus*, zatim rod *Lissotriton* koji se sastoji od svih malih mrmoljaka i na rod *Messotriton* samo za *T. alpestris*. Drugi tim (Litvinchuk i sar. , 2005) predlaže uključenje *T. vittatus* u poseban rod, *Ommatotriton*, i naziv roda *Lophinis* za sve male mrmoljke.

Današnje vrste velikih mrmoljaka su imale status podvrsta do osamdesetih godina 20. veka kada su na osnovu kriterijuma hibridizacije, odlike kariotipa, genetičkih udaljenosti podvrsta (Callan i Spurway, 1951; Kalezić i Hedgecock, 1980) uzdignute na nivo vrste. Zbog parapatričke distribucije sa ograničenom hibridizacijom (Wallis i Arntzen, 1989), vrste velikih mrmoljaka se označavaju kao pripadnici grupe vrsta koja ima odlike „nadvrste“ [engl. *superspecies*, *sensu* Rensch (1929)]. Veliki mrmoljci imaju monofiletsko poreklo. Centar njihovog postanka i diverziteta je Balkansko poluostrvo (Crnobrnja-Isailović i sar., 1997, Arntzen i sar. 2007). Danas grupu velikih mrmoljaka (*Triturus cristatus* superspecies) čini šest vrsta roda *Triturus* sa parapatričkom distribucijom i hibridizacijom u zonama kontakta (Espregueira Themudo i sar., 2009):

1. *T. dobrogicus* (Kiritzescu, 1903), vrsta podunavlja;
2. *T. cristatus* (Laurenti, 1768), vrsta centralne, zapadne i severne Evrope;
3. *T. karelinii* (Strauch, 1870), vrsta dela istočnog Balkana i Azije;
4. *T. arntzeni* (Litvinchuk, Borkin, Džukić i Kalezić, 1999), vrsta istočnog Balkana;
5. *T. carnifex* (Laurenti, 1768), vrsta Apeninskog poluostrva i dela Balkana i
6. *T. macedonicus* (Karaman, 1922), vrsta južnog i centralnog Balkana.



**Slika 1.2.1.** Distribucija mrmoljaka roda *Triturus* (prema Espregueira Themudo i sar., 2009., modificovano)

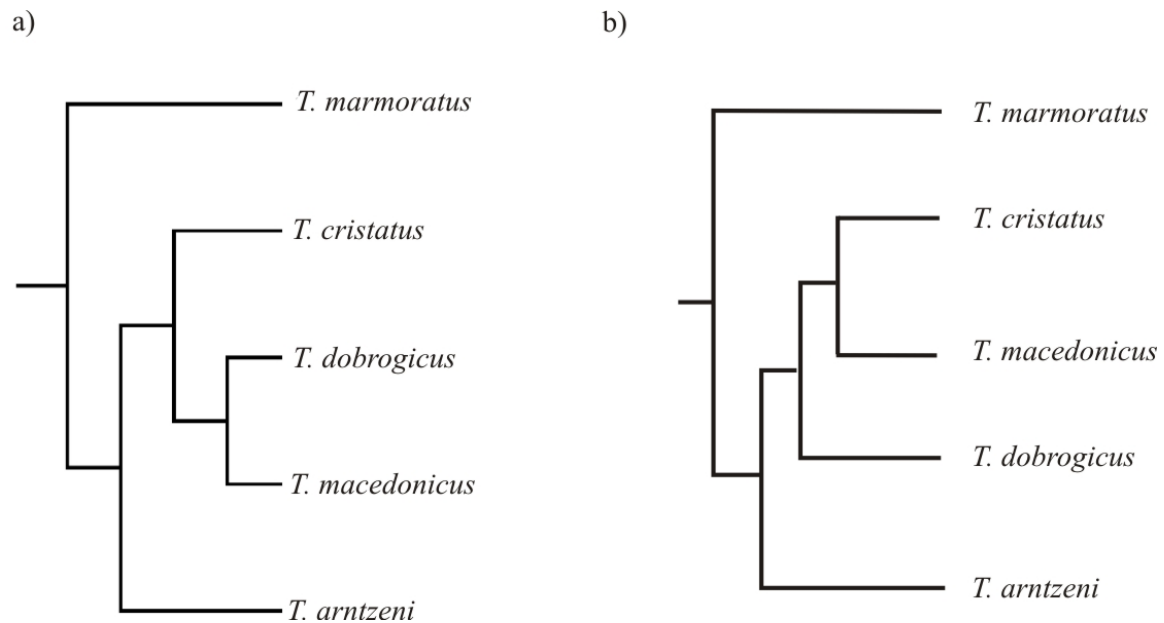
Pretpostavka je da su se vrste odvojile od zajedničkog pretka i da se njihova radijacija desila pre 10-12 miliona godina u relativno kratkom vremenskom razdoblju. U to vreme su se pojavljivale glavne geografske barijere između vrsta (Arntzen i sar., 2007; Espregueira Themudo i sar., 2009). Po poslednjim analizama rađenim na nuklearnim i mitohondrijalnim genima, utvrđeno je da se sestrinske vrste *Triturus arntzeni* i *T. karelinii* nalaze u osnovi stabla dok ostalu grupu čine preostale četiri vrste. U toj grupi se odvaja klada *T. dobrogicus* od ostalih vrsta i zatim *T. cristatus* od grupe sestrinskih vrsta *T. macedonicus* i *T. carnifex* (Espregueira Themudo i sar., 2009) (slika 1.2.2.). Najnovija istraživanja genetičke varijabilnosti bazirana na mitohondrijskoj DNK ukazuju na postojanje dodatnih filogenetskih klada unutar *T. karelinii* na prostoru Male Azije (Wielstra i sar., 2010).

### **Biologija vrste i odlike životne istorije velikih mrmoljaka**

Veliki mrmoljci se odlikuju složenim životnim ciklusom. Ovi mrmoljci su uglavnom vezani za šumske ekosisteme, i to uglavnom listopadne, sa stajaćim vodama na glinovitoj podlozi znatne dubine i obrasle vodenom vegetacijom.

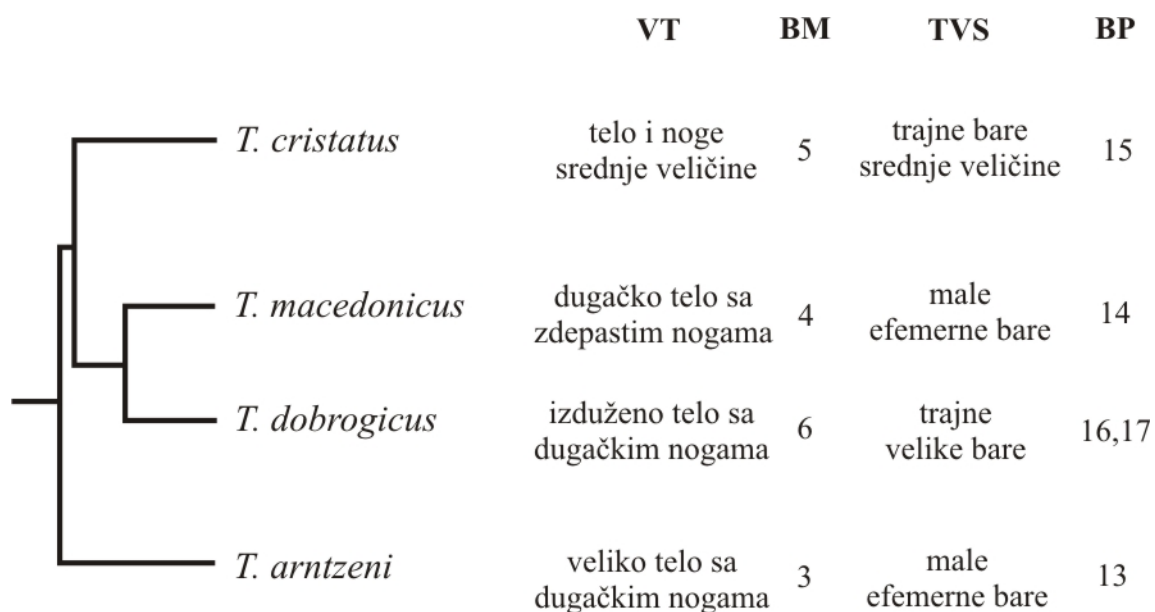
Takođe se mogu naći i u sporotekućim vodama. I larve i adulti se hrane raznim beskičmenjacima koji se mogu naći i u vodi i u zemljištu. Leto i zimu provode na kopnu na vlažnim i senovitim mestima. Pojavom mraza, mrmoljci ulaze u fazu hibernacije. Posle hibernacije, polno zrele jedinke se upućuju ka vodama radi reprodukcije koja počinje krajem februara i početkom marta. Tada im se za samo par dana menjaju spoljašnja morfologija i način ponašanja: dorzalna kresta kod mužjaka i „svadbena igra“. Ženke su veće od mužjaka iako dimorfizam nije izrazit (Kalezić i sar. 1992; Ivanović i sar. 2008). Mužjaci polažu spermatofore koje potom ženke preuzimaju svojom kloakom. Oplođenje se vrši u kloaci ženke (Džukić, 1993). Parenje se odvija od marta do juna, a zatim adulti napuštaju vodu i prelaze na kopno. Prosečan broj jaja koja jedna ženka velikih mrmoljaka položi tokom više nedelja je oko 200. Ženke svako jaje posebno zalepe za biljke u vodi i na taj način ih štite od predatora kao i od ultra-violetnog zračenja (Miaud, 1994; Marco i sar., 2001; Orizaola i Brana, 2003). Jaje se sastoji od vitelusa čiji je prečnik u proseku 2.5mm i koji je obavijen galertom (želatinozni omotač koji štiti vitelus od isušivanja, od raznih mehaničkih povreda, gljivičnih infekcija i ultravioletnog zračenja (Duellman i Trueb, 1994; Griffiths, 1996; Licht i Grant, 1997). Od ukupnog broja položenih jaja, skoro 50% (38-62%) embriona ne nastavlja razvoj zbog genetskog problema u razviću izazvanog anomalijom hromozoma 1 (Wallace, 1987; D'Amen i sar., 2006). Iz jaja se posle 2 do 3 nedelje izvaljuje larva koja je u proseku 12mm duga i koja je slobodnoživeća u vodi. Larveno razviće traje nekoliko meseci (obično do kraja leta ili početka jeseni) kada procesima metamorfoze larva prelazi u juvenilnu jedinku, približno 70 mm dugu (Griffiths, 1996). Juvenilne jedinke po metamorfozi napuštaju vodenu sredinu. Metodom skeletohronologije procenjeno je da polnu zrelost stižu, u proseku, sa 3 godine i mužjaci i ženke (Cvetković i sar. 1996, Cogalniceanu i Miaud, 2002, 2003; Uzum i Olgun, 2009).

## Filogenetski odnosi i karakteristike analiziranih vrsta



**Slika 1.2.2.** Filogenetski odnosi analiziranih vrsta velikih mrmoljaka sa vrstom *T. marmoratus* kao vangrupnim taksonom prema Espregueira Themudo i sar. 2009.: a) bazirano na sekvencama dva mitohondrijska i pet nuklearnih gena, modifikovano i b) bazirano na pet nuklearnih gena, modifikovano.

Karakteristično za fenotipsku evoluciju velikih mrmoljaka je da interspecijske razlike pokazuju oblik kline sa vrstom *T. dobrogicus* i vrstama *T. karelinii* i *T. arntzeni* na suprotnim polovima, pri čemu je vrsta *T. cristatus* bliža vrsti *T. dobrogicus*, dok su bliske vrste *T. carnifex* i *T. macedonicus* bliže vrstama *T. karelinii* i *T. arntzeni*. Svi ovi rezultati ukazuju na postojanje paralelne evolucije u brojnim fenotipskim odlikama koje su u vezi sa specifičnim zahtevima svake vrste vezano za životnu sredinu (slika 1.2.3.).



**Slika 1.2.3.** Filogenetski odnosi analiziranih vrsta velikih mrmoljaka na osnovu filogenetskog stabla za rod *Triturus* dobijenog analizama DNK sekvenci iz dva mitohondrijska i pet nuklearnih gena (iz Espregueira Themudo i sar., 2009) sa pregledom njihovih morfoloških i ekoloških karakteristika: VT – veličina tela (Arntzen i Wallis, 1999); BM – broj meseci provedenih u vodi godišnje (Arntzen, 2003); TVS – tip vodenog staništa (Arntzen, 2003); BP – broj pršljena (Lanza i sar., 2010).

### 1.3. Evolucioni aspekti životnih istorija

Polazeći sa stanovišta da ekološki faktori utiču na pravac i intezitet delovanja selekcije, proizilazi da se odlike životne istorije organizma mogu posmatrati kao skup ko-adaptivnih osobina koje je prirodna selekcija «stvorila» kao odgovor na ekološke odlike životne sredine (Stearns, 1976).

Niz fenotipskih odgovora na sredinske uslove može često predstavljati adaptaciju koja je evoluirala pod delovanjem prirodne selekcije. To ne znači nužno da su svi odgovori na sredinske uslove adaptivni, već samo oni koji povećavaju sposobnost jedinke da se reprodukuje i preživi pod tim uslovima

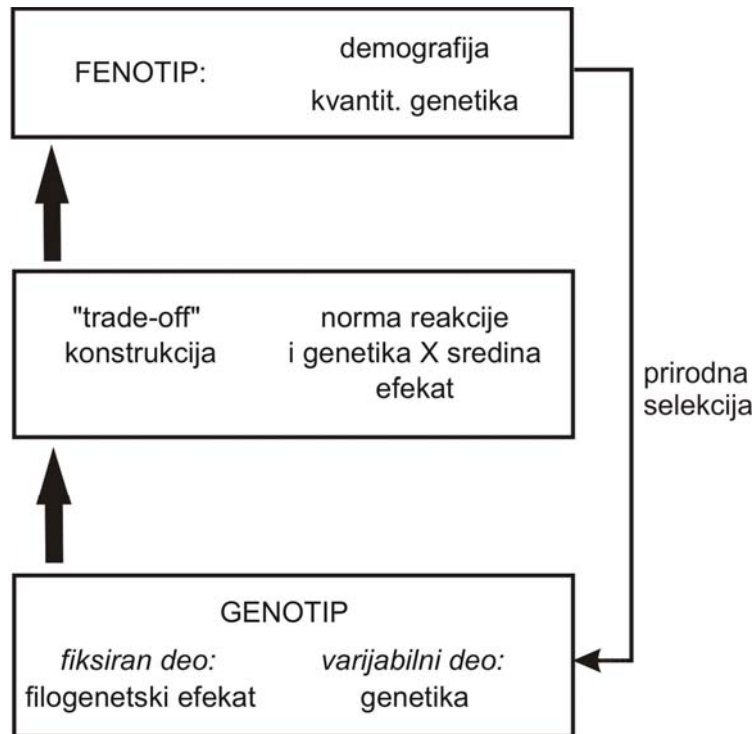
(Newman 1992). Ti uzroci koji dovode do variranja osobina životnih istorija mogu biti sredinski faktori, kao što su temperatura, količina padavina, prisustvo predatora, kompeticija, kao i genetički faktori (npr. Sorci i sar., 1996, Miaud i sar., 2000). Takođe, odlike životnih istorija su varijabilne na više nivoa: između vrsta, između konspicijskih populacija, kao i unutar populacija (Roff, 2005). Odlike životne istorije ne predstavljaju nužno „rešenja“ na trenutne ekološke uslove, već mogu i da predstavljaju nasleđe od predačkih populacija ili taksona (Coddington, 1988). Takođe, na osobine životne istorije utiče samo razviće, odnosno, odlike životnih istorija jesu deo ontogenije i procesi razvića mogu integrisati ili razdvojiti stadijume životnog ciklusa (Zelditch i sar., 2003; Garfield i Wray, 2009).

Razlike u ranom razviću mogu postojati i između srodnih vrsta (Garfield i Wray, 2009). Nastajanje takvih razlika može se tumačiti preko različitih adaptacija koje su nastale promenama odlika životne istorije, npr. modifikacije u ishrani embriona, promene u mogućnosti širenja larvi i njihovi odbrambeni mehanizmi ili promenama u embrionalnom okruženju (Garfield i Wray, 2009).

Analizama demografskih karakteristika, genetičke varijabilnosti i evolucione istorije, moguće je istražiti evolucione procese i mehanizme koji dovode do varijabilnosti životnih istorija. Osnovne odlike životnih istorija (npr. stopa rasta, veličina tela, uzrasno-specifična reprodukcija, uzrasno-specifični mortalitet) predstavljaju demografske karakteristike na osnovu kojih je moguće proceniti uticaj prirodne selekcije na odlike životne istorije. Sa druge strane, kvantitativno-genetičkim istraživanjima utvrđuje se varijabilnost na nivou genotipa koja nastaje kao odgovor na delovanje prirodne selekcije, tj., mehanizmi njenog održavanja i ispoljavanja (npr. Stearns, 1983a; Stearns i sar., 1991).

Analizom evolucione istorije, utvrđuje se filogenetski efekat, tj. zajedničke odlike životne istorije, nasleđene od zajedničkog pretka. Na primer, u najjednostavnijem obliku, filogenetski efekat ogleda se u tome što su neke odlike životnih istorija fiksirane na višem taksonomskom nivou (npr. sve ptice reda *Procellariiformes* imaju leglo od samo jednog jajeta) (Stearns 1983b, 1984; Winemiller i Rose, 1992).

Konačno, da bi se razumeo “obrazac” variranja odlika životnih istorija, bilo između vrsta ili na populacionom nivou, potrebne su nam informacije o filogenetskom efektu, fenotipskoj varijabilnosti, genskoj varijabilnosti, uzajamnim ograničenjima odlika („trade-offs“), i selekcionim pritiscima (Slika 1.3.1).



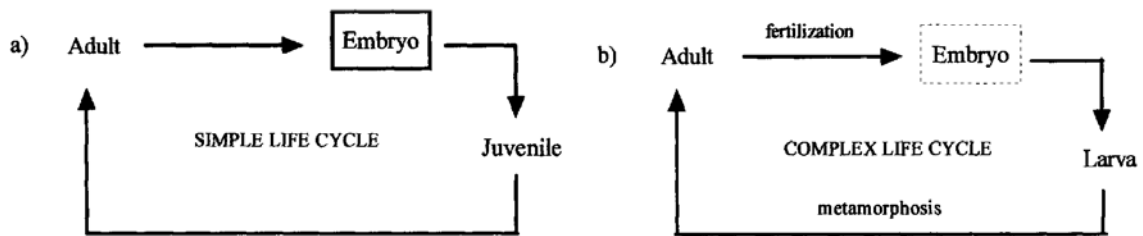
**Slika 1.3.1.** Shema evolucione kauzalnosti (po Stearns, 1992)

Jedna od najmarkatnijih karakteristika životne istorije vodozemaca je metamorfoza, odnosno složen životni ciklus (Slika 1.3.2.). Generalno, vodozemce karakteriše da u svom životnom ciklusu imaju dva ekološki različita razvojna stadijuma. Larve su ekološki različite u odnosu na metamorfozirane jedinke (juvenilne jedinke i adulte), žive u drugačijim staništima, koriste drugačije resurse, izložene su drugačijim kompetitivnim interakcijama i imaju drugačije predatore (Istock, 1967). U takvom životnom ciklusu, juvenilni stadijum se dostiže metamorfozom slobodnoživećih larvi.

Kod mnogih organizama sa larvenim stupnjem, metamorfoza uključuje pravu „revoluciju“ u morfologiji, ekologiji i ponašanju. Takvi „kompleksni životni

ciklusi“ (Istock, 1967) su posebno poznati kod vodozemaca i nekih grupa kolousta i riba (Hall i Wake, 1999), kao i kod mnogih beskičmenjačkih grupa (Gilbert i Frieden, 1981). Ključne komponente kompleksnih životnih ciklusa su vreme metamorfoze, veličina larve pri metamorfozi i veličina metamorfoziranih jedinki (Pechenik, 2001).

Potencijalne prednosti postojanja larvenog stupnja u životnom ciklusu su različite, npr. (1) smanjenje kompeticije između roditelja i larvi za prostor i hranu; (2) razviće u sredinama koje su potencijalno sigurnije i imaju više hrane; (3) mogućnost da se proširi areal rasprostranjenja kod grupa koje imaju sedentarne adultne jedinke (Pechenik, 1999).



**Slika 1.3.2.** Shematski prikaz dva različita životna ciklusa. Puna linija predstavlja „zaštićeni stadijum“, dok isprekidana linija predstavlja slobodno-živeći stadijum (iz Pechenik, 2001).

Opšti „obrazac“ životnog ciklusa vodozemaca uključuje oviparnu reprodukciju sa postojanjem larvi i transformaciju larvi u juvenilnu jedinku procesima metamorfoze i potom dostizanje polne zrelosti čime ona prelazi u adultnu jedinku. Metamorfoza podrazumeva čitav niz promena u morfologiji i fiziologiji. Tako, tokom metamorfoze dolazi do regresije morfoloških celina i funkcija značajnih samo za larve kao i transformacije nekih larvenih struktura u oblike „korisne“ juvenilnim i adultnim jedinkama. Promene koje se dešavaju tokom metamorfoze kod repatih vodozemaca su: zadebljanje integumenta i formiranje kožnih žlezda i promene u kožnim pigmentima, osifikacija skeleta,



resorpcija repnog nabora i zadebljavanje repnog mišića, resorpcija spoljašnjih škrga i zatvaranje škržnih otvora (Duellman i Trueb, 1994). Ove, promene započinju na stupnju larve i odigravaju se naglo, u relativno kratkom vremenskom periodu i pod uticajem su hormona. Kod bezrepih vodozemaca dolazi do resorpcije repa i dela skeletnog sistema, promene u digestivnom traktu, rasta zadnjih i prednjih nogu i resorpcije škrga i dodatnih struktura vezanih za njih. Za obe grupe vodozemaca važi da metamorfozom dolazi i do promene staništa, akvatične u terestriču.

Dužina larvene faze, tj. vreme metamorfoze je bitna karakteristika koja je u velikoj meri pod uticajem sredinskih faktora (biotičkih i abiotičkih karakteristika vodenog staništa u kome žive larve) (Denver, 1997; Laurila i sar., 2002; Orizaola i Braña, 2005; Cohen i sar., 2006). Fenotipska plastičnost dužine trajanja larvene faze je izražena u većoj ili manjoj meri. Razlike postoje između vrsta - tako larve nekih bezrepih vodozemaca prezimljavaju i ne transformišu se do narednog leta, dok kod nekih proces metamorfoze počne odmah nakon nekoliko dana. Različitost postoji i unutar grupa pa čak i unutar populacija (kod repatih vodozemaca neke larve zadržavaju larvene karakteristike i ne završavaju proces metamorfoze - fakultativna pedomorfoza (Kalezić i sar., 1994).

Takođe, bitno je i uzajamno ograničenje između vremena metamorfoze i veličine larve pri metamorfozi (Wilbur i Collins, 1973). Postoji nekoliko objašnjenja kako veličina larve i vreme metamorfoze utiču na adaptivnu vrednost juvenilnih jedinki. Produžen larvalni period može povećati predatorski pritisak ili da ih izloži nepovoljnim uslovima u sredini u kojoj žive (npr. prevremeno isušivanje bara, naglo zahlađenje, itd.). Ukoliko nema nikakvog pritiska, larva će „favorizovati“ duže larveno razviće da bi metamorfozirala sa većom veličinom tela što pruža mnoge prednosti (lakše i brže beže od predatora; lakše love plen, ranije polno sazrevanje i veći fekunditet). S druge strane, ukoliko su nepovoljni sredinski uslovi u kojima žive larve, adaptivna vrednost će se povećati ako se metamorfozira ranije (Newman, 1992).

Vodozemci sa složenim životnim ciklusom koriste dve ekološke niše. Za brz larveni rast oni iskorišćavaju prednost veće primarne produkcije u vodenim

staništima. Pri tome, vreme metamorfoze predstavlja «adaptivni balans» između brzog rasta u tim staništima i rizika od mortaliteta ukoliko dođe do isušivanja bara. Takođe, dve vrste mogu da smanje zonu preklapanja niša pomeranjem određenih događaja životnih istorija (Wilbur, 1980).

Veličina tela jedinki nove generacije je u evolucionom i ekološkom pogledu jedna od ključnih odlika životnih istorija jer količina energije koja je uložena u produkciju novih jedinki, kao i njihova veličina potomaka utiču na adaptivnu vrednost majke i potomaka (Bernardo, 1996). Takođe, veličina potomaka je odlika na koju deluje selekcija i u roditeljskoj i u potomačkoj generaciji. Ta selekcija često varira u pravcu između generacija (roditelji i potomci), kao i između životnih sredina. Veličina jaja je važna adaptivna karakteristika i predstavlja direktno ulaganje majke u reprodukciju (Duellman i Trueb, 1994). Od veličine jaja zavisi preživljavanje potomaka, odnosno njihova stopa rasta i razvića, veličina i oblik tela (Kaplan i King, 1997). Razni sredinski i genski faktori utiču na veličinu jaja (Berven, 1982). Takođe, veličina jaja zavisi i od učestalosti reprodukcije. Kod vrsta koje se reprodukuju više puta tokom godine imaju sitnija jaja u odnosu na vrste koje polažu jaja jednom godišnje. Larve koje se izlegu iz većih jaja imaju veću adaptivnu vrednost u odnosu na larve iz manjih jaja jer imaju veće početne dužine tela, veću stopu rasta i sa tim u vezi veću stopu preživljavanja i raniju metamorfoziraju (Kaplan, 1980; Berven i Chandra, 1988; Kalezić i sar., 1994; Loman 2002).

Ukupan broj jaja koji jedinka može da stvori je u direktnoj vezi sa veličinom jaja. Fekunditet je direktno zavisao od veličine i oblika tela ženke (Kaplan i Salthe, 1979; Kalezić i sar., 1992; Duellman i Trueb, 1994). Pošto je prostor za skladištenje jaja u telu ženke ograničen, postoji uzajamno ograničavanje između broja jaja i njihove veličine, tj. ako je broj jaja veći, njihova veličina će biti manja. Broj jaja i njihova veličina variraju u zavisnosti od sredinskih uslova. Ženke u populacijama koje nastanjuju hladnija staništa (velika nadmorska visina ili geografska širina) su obično veće u odnosu na ženke konspicijskih populacija na nižim nadmorskim visinama pa mogu da imaju veći fekunditet ili veća jaja (Berven, 1982; Kalezić i sar., 1992; Ryser, 1996; Miaude i

sar., 1999). To se odnosi na neke vrste evropskih mrmoljaka (*M. alpestris* i *L. vulgaris*), zatim kod jedne vrste velikih mrmoljaka (*T. carnifex*, Ficaretola i sar. 2010), ali ne i za neke druge vrste velikih mrmoljaka (*T. macedonicus*) (Krizmanić i sar. 2005).

## 1.4. Ciljevi studije

Jedno od ključnih pitanja teorije životne istorije je utvrđivanje faktora, kao i procesa i mehanizma koji dovode do variranja osobina životne istorije. Kako grupa velikih mrmoljaka (*Triturus cristatus* superspecies) ima monofiletsko poreklo, može se pretpostaviti da su te vrste nasledile isti obrazac razvića i iste odlike životne istorije od zajedničkog pretka (npr. Felsenstein, 1985). Uz ogradu, kao što je ranije istaknuto, filogenetska ograničenja mogu značajno uticati na evoluciju životne istorije.

Već je pomenuto da se srodne vrste mogu razlikovati i u ranom razviću. Ove razlike su najčešće uslovljene promenama odlika životne istorije: modifikacije u ishrani embriona, promene u mogućnosti širenja larvi i njihovi odbrambeni mehanizmi ili promenama u embrionalnom okruženju (Garfield i Wray, 2009). Važno je istaći da veće promene u odlikama životne istorije mogu da predstavljaju ključne promene koje dovode do razdvajanja vrsta (Givnish i Sytsma, 1997).

Do danas, mali je broj radova koji se bavi baš ovom problematikom tj. razlikama između srodnih vrsta velikih mrmoljaka u ranim karakteristikama životnih istorija (Kalezić i sar., 1994; Griffiths, 1996; Arntzen, 2003; Litvinchuk i sar., 2007).

U okviru ove teze istraživane su odlike ranih životnih istorija četiri vrste velikih mrmoljaka (*Triturus macedonicus*, *T. arntzeni*, *T. cristatus* i *T. dobrogicus*). Ciljevi ove teze su sledeći:

- utvrđivanje razlika između vrsta u karakteristikama jaja u pogledu veličine;
- utvrđivanje razlika u odlikama životnih istorija tokom embrionalnog perioda između vrsta: u stopi embrionalnog razvića i korelacijama između odlika životnih istorija tokom embrionalnog razvića;
- utvrđivanje razlika u odlikama životnih istorija tokom larvenog perioda između vrsta: stope rasta larvi, vreme metamorfoze i veličine larvi pri metamorfozi,
- poređenje promena oblika tela tokom ontogenije i poređenje ontogenetskih putanja analiziranih vrsta.
- filogenija osobina životne istorije velikih mrmoljaka

Varijabilnost navedenih osobina životne istorije, kao i ontogenija oblika tela, može ukazati na evolucione procese, značaj filogenetskih ograničenja i ograničenja uslovljenih programima razvića, kao i na mehanizme koji su doveli do divergencije i adaptivne radijacije u okviru ove grupe repatih vodozemaca (Wake, 2009). Rezultati ovih istraživanja će dati detaljniji uvid u interspecijske razlike odlika životnih istorija ove grupe i vode boljem poznavanju biologije ovih vrsta. Takođe, rezultati ovakvih istraživanja zajedno sa istraživanjima iz ostalih oblasti daju značajan doprinos zaštiti i očuvanju grupe velikih mrmoljaka.

## 2. MATERIJAL I METODE

### 2.1. Pregled analiziranih uzoraka populacija mrmoljaka

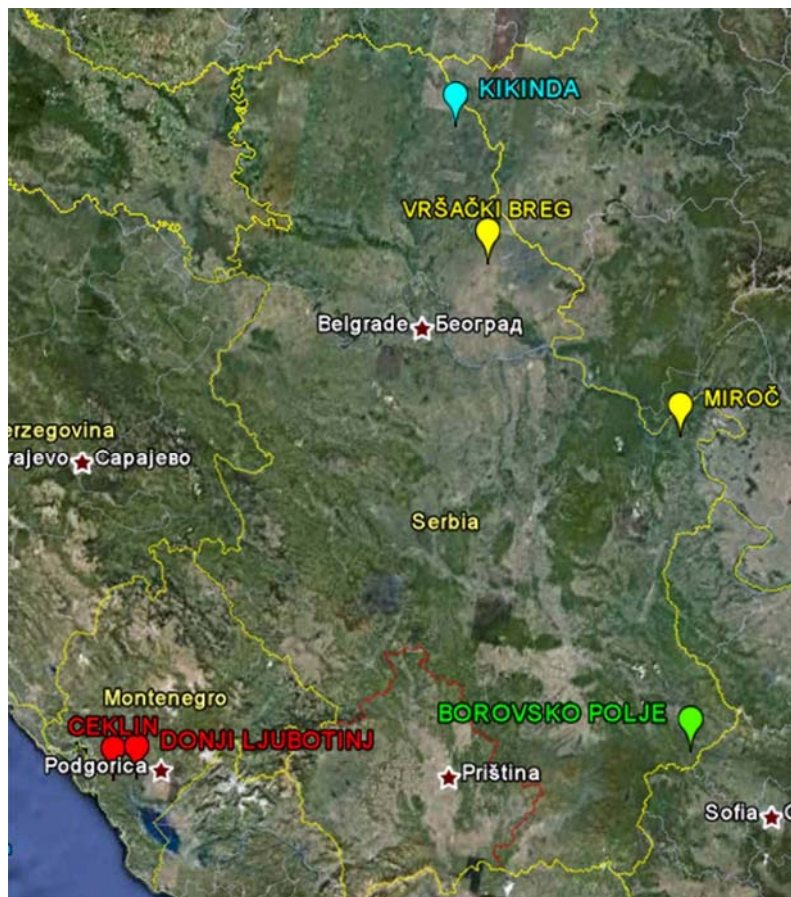
U cilju istraživanja razlika u odlikama životnih istorija, kao i u analizama promene oblika tela, prikupljeni su uzorci mužjaka i ženki četiri vrste velikih mrmoljaka (*Triturus cristatus* superspecies) prisutnih na teritoriji Srbije i Crne Gore. Analizirane vrste su:

- *Triturus cristatus* (Laurenti, 1768) – **Veliki mrmoljak**
- *Triturus dobrogicus* (Kiritzescu, 1903) – **Podunavski mrmoljak**
- *Triturus macedonicus* (Karaman, 1922) – **Makedonski glavati mrmoljak**
- *Triturus arntzeni* (Litvinchuk, Borkin, Džukić i Kalezić, 1999) – **Arncenov dugonogi mrmoljak**



Slika 2.1.1. Analizirane vrste velikih mrmoljaka

Jedinke su prikupljene na samom početku perioda reprodukcije i polaganja jaja. Ženke su imale vidno uvećan abdomen, a mužjaci jasno izražene dorzalne kreste. Jedinke vrste *T. cristatus* su prikupljene u aprilu 2006. godine na lokalitetima Miroč (44° 29' N, 22° 20' E, 440m, 5 ženki) i jedna ženka na lokalitetu Vršački breg (45° 06' N, 21° 27' E, 180m). Jedinke vrste *T. dobrogicus* su sakupljene sa jednog lokaliteta u okolini Kikinde (Banatsko Veliko selo) u martu 2006. godine (45° 49' N, 20° 27' E, 73m, 5 ženki). Jedinke vrste *Triturus macedonicus* su sakupljene na dva lokaliteta u Crnoj Gori u martu 2008. godine: 6 ženki sa lokaliteta Ceklin (42° 21' N, 18° 58' E, 315m) i jedna ženka sa lokaliteta Donji Ljubotinj (42° 23' N, 19° 07' E, 225m). Jedinke vrste *Triturus arntzeni* su sakupljene u aprilu 2008. godine u okolini Pirota, na lokalitetu Borovsko polje (42° 58' N, 22° 43' E, 890m, 8 ženki).



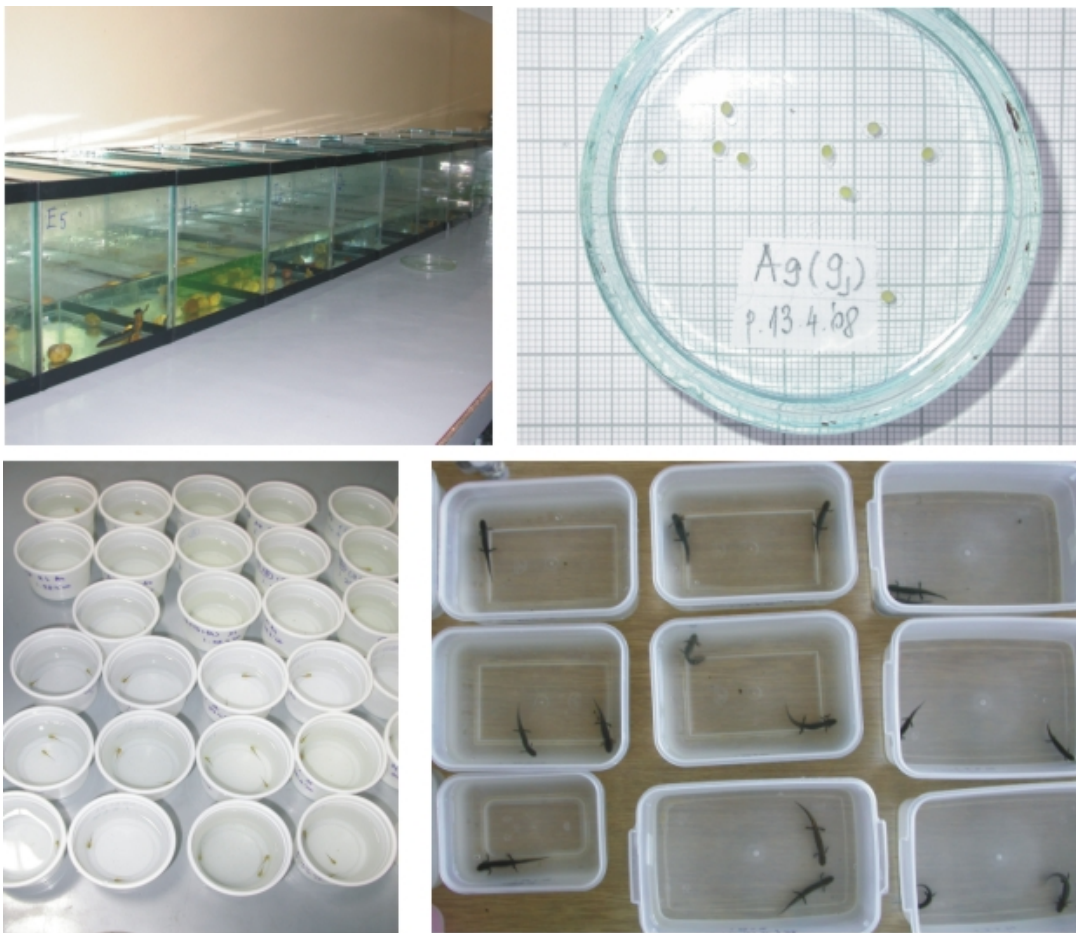
**Slika 2.1.2.** Pregled geografskog položaja lokaliteta analiziranih populacija

## 2.2. Dizajn eksperimenta

Brojni ekološki faktori (npr. temperatura, nadmorska visina, trofički resursi, prisustvo predatora) utiču na stopu rasta larvi kao i na dužinu trajanja larvene faze (Miaud i Merila, 2001; Orizaola i Brana, 2005), a i dužina embrionskog razvića je u direktnoj vezi sa spoljašnjom temperaturom (D'Amen i sar., 2007). Analizirane vrste vrste velikih mrmoljaka pokazuju razlike u optimalnim ekološkim parametrima, uključujući temperaturu (Litvinchuk i sar., 2007). Vrste *T. dobrogicus* i *T. cristatus* se mogu okarakterisati kao mezofilne u odnosu na termofilnije vrste (*T. macedonicus* i *T. arntzeni*). Zbog različitih optimalnih temperatura koje su karakteristične za ove vrste, eksperiment je organizovan u različitim kontrolisanim i konstantnim eksperimentalnim uslovima. Tako su vrste *T. dobrogicus* i *T. cristatus* gajene na temperaturi od 16-17 °C, dok su vrste *T. macedonicus* i *T. arntzeni* gajene na 18-19 °C.

Ženke koje su prikupljene na terenu prebačene su u roku od 24h u laboratoriju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Donete ženke su smeštane pojedinačno u akvarijume zapremine 12 litara sa 6 litara dehlorisane vode. Voda im je menjana svakih 7 do 10 dana. U akvarijume su postavljene po dve providne PVC trake dimenzija 20 x 2 cm sa perastim zarezima po bočnim ivicama. Ove trake postavljene su kao podloga za polaganje jaja. Prednost takvih traka u odnosu na prirodnu vegetaciju na koju ženke mrmoljaka inače u prirodu polažu jaja, je u tome što se lako može primetiti položeno jaje i skinuti bez oštećenja. Životinje su hranjene svaki drugi dan crvima muva i *Tubifex* crvićima. Svakodnevno je praćeno da li ima položenih jaja. Tek položena jaja su skidana sa PVC traka i prebacivana u Petri kutije, prečnika 5cm koje su napunjene sa dehlorisanom vodom. Voda u Petri kutijama je menjana svaki drugi dan. U Petri kutije je stavljano najviše deset jaja po kutiji zbog mogućeg međusobnog indukovanja i koordinacije razvića hemijskom komunikacijom između embriona i zbog mogućeg širenja gljivičnih infekcija. Tokom embrionalnog razvića, jaja i embrioni koji nisu nastavili sa razvićem redovno su uklanjani. Po izvaljivanju,

larve su smeštane u plastične čašice zapremine 100ml sa dehlorisanom vodom. Voda je menjana svaki drugi dan. Pošto gustina populacije utiče na veličinu larvi kod vodozemaca (Berven i Chadra, 1988; Kohmatsu i sar., 2001) broj larvi u čašicama, a kasnije kutijama je bio od jedne do maksimalnih tri i taj broj je održavan konstantno tokom čitavog eksperimenta. Po otvaranju usnog otvora, tj. po početku aktivne ishrane (3-5 dana nakon izvaljivanja) larve su hranjene račićima roda *Artemia*. Starije, odnosno krupnije larve hranjene su sa *Tubifex* crvićima. Po dostizanju starosti od 30 dana od izvaljivanja, larve su su prebacivane u plastične kutije zapremine 1 litar u kojima su nastavljale razviće sve do metamorfoze. Za metamorfozirane jedinice uzimane su jedinice kod kojih su spoljašnje škrge potpuno resorbovane i škržni otvori potpuno zatvoreni.



**Slika 2.2.1.** Dizajn eksperimenta



## 2.3. Analize

### 2.3.1. Karakteristike jaja

Za utvrđivanje varijabilnosti i eventualnih razlika u karakteristikama jaja između analiziranih vrsta, kao i za analizu varijabilnosti u karakteristikama jaja između populacija i ženki unutar vrsta, korišćen je i dodatni uzorak (Tabela 2.3.1.). Veličine jaja velikih mrmoljaka su merena odmah po polaganju. Zalepljena jaja su skupljana svakog dana i fotografisana fotoaparatom marke Nikon Coolpix 4500 sa razmernikom od 10mm. Radi utvrđivanja razlika u veličini jaja između vrsta, sa fotografija su mereni prečnik vitelusa i dužina i širina galernog omotača uz upotrebu programa za kompjutersku grafičku analizu UTHSCSA ImageTool 3.0. (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). Tim merama su izračunati zapremina vitelusa, zapremina galernog omotača i određen je odnos između vitelusa i galerte. Zapremina vitelusa je dobijena pomoću formule  $V = 4/3\pi r^3$ , gde je  $r$  prečnik vitelusa. Zapremina galerte je dobijena korišćenjem formule za zapreminu elipsoidnih oblika:  $V=4/3\pi(R_1/2)(R_2/2)(R_2/2)$ , pri čemu je  $R_1$  dužina galerte, a  $R_2$  širina galerte. Njihove zapremine su dobijene u  $\text{mm}^3$ . Merena je i veličina ženki koje su polagale jaja, digitalnim pomičnim merilom sa tačnošću od 0.01mm. Kao mera veličine ženki, korišćena je standardna dužina tela merena od vrha njuške do zadnje ivice kloake (SVL) u milimetrima.

#### **Statističke analize**

Sve statističke analize su rađene u programu SAS (verzija 9.1.3., Institut 2006). Da bi se postigla normalnost raspodele merenih veličina u uzorku, sve mere su logaritmovane (Fernandez, 1992). Dvofaktorska analiza varijansi je rađena da bi se utvrdile moguće razlike između vrsta, kao i između ženki unutar vrsta. Takođe, rađena je i analiza varijansi kao i post-hoc testovi da bi se utvrdile razlike između svake vrste u pomenutim karakteristikama jaja. Pošto je veličina

jaja korelisana sa veličinom ženki (Kaplan i Salthe, 1979), njihov relativan odnos analiziran je primenom II tipa regresije, modelom standardizovanih osa (Warton i sar., 2006). U ovoj analizi, obe promenljive se posmatraju kao zavisno promenljive, uključujući i grešku merenja za svaku promenljivu. Zbog ovih osobenosti, model standardizovanih osa (II tip regresije) preporučuje se u analizama alometrijskih odnosa i analizama međusobnih odnosa morfometrijskih karakteristika, kao što je u ovom slučaju odnos veličine jaja i veličine ženki. Relativni odnos između veličine vitelusa i veličine tela ženki utvrđen je regresijom srednje vrednosti prečnika vitelusa za svaku ženku u odnosu na dužinu te ženke. Razlike u relativnim odnosima veličine vitelusa i veličine ženki između vrsta (razlike u nagibu i visini regresionih linija) analizirane su primenom SMATR programa, verzija 2.0. (Falster i sar., 2006). Primenom ovog algoritma moguće je analizirati međusobne odnose regresionih prava kao i relativan položaj vrsta koje se porede u odnosu na veličinu vitelusa, odnosno veličinu ženke.

**Tabela 2.3.1.** Pregled vrsta i populacija koje su korišćene za analizu varijabilnosti u karakteristikama jaja.

<b>Vrsta</b>	<b>Lokalitet</b>	<b>Koordinate</b>		<b>Nad.visina</b>	<b>Vreme uzorkovanja</b>	<b>Br. Ženki</b>
<i>T. macedonicus</i>	Ceklin	42° 21' N	18° 58' E	315m	Mart, 2007	4
	Rid	42° 23' N	19° 03' E	300m	Mart, 2007	1
	Progonovići	42° 25' N	19° 04' E	443m	Mart, 2007	2
<i>T. cristatus</i>	Miroč	44° 29' N	22° 20' E	440m	April, 2007	8
	Vršački breg	45° 07' N	21° 27' E	300m	April, 2006	4
<i>T. dobrogicus</i>	Kikinda	45° 49' N	20° 27' E	73m	Mart, 2006	5
	Opovo	45° 03' N	20° 25' E	67m	Mart, 2005	5
<i>T. arntzeni</i>	Pirot	43° 09' N	22° 35' E	367m	April, 2005	5

### 2.3.2. Embrionsko razviće

Razviće embriona velikih mrmoljaka praćeno je u eksperimentalnim uslovima. Brazdanje oplođene jajne ćelije poćinje neposredno po polaganju. Dalje embrionsko razviće praćeno je u odrećdenim vremenskim intervalima: na 7, 11 i 15 danu starosti embriona od trenutka polaganja jaja (S7, S11 i S15), Embrioni su pregledani pod binokularnom lupom i beležen je stadijum razvića svakog embriona. Stadijumi razvića embriona utvrćdivani su uz pomoć kljuća za odrećdivanje embrionskih stadijuma za planinskog mrmoljka (*Mesotriton alpestris*) (Knight, 1938). Zbog moguće mećusobne hemijske interakcije izmećdu embriona (Hall, 1999 i 2003), odnosno, mećusobne koordinacije razvića, u daljim analizama uziman je stadijum koji se najćešće javlja u okviru inicijalne grupe od 10 jaja u svakoj Petri kutiji (medijana stadijuma razvića embriona za svaku Petri kutiju za svaki vremenski interval). Uginuli embrioni su redovno uklanjani. Osim osobina ranog razvića praćene su i druge odlike životne istorije.

Analizirane su sledeće odlike:

1. **DO** (day of oviposition) – dan kada je položeno jaje u odnosu na ceo period ovipozicije;
2. **NE** (number of eggs) – broj položenih jaja po kohorti;
3. **RV** (vitellus diameter) – prosećan prećnik vitelusa;
4. **VG** (volume of gallerta) – prosećna zapremina galertnog omotaća koja je izraćunata kao razlika izmećdu zapremine celog jajeta i zapremine vitelusa;
5. **NH** (number of hatched larvae) – broj izvaljenih larvi od ukupnog broja položenih jaja;
6. **TL** (total lenght of hatched larvae) – totalna dućina izvaljenih larvi;
7. **EP** (duration of embrionic period) – dućina trajanja embrionskog perioda embriona;
8. **SR** (survival rate of embryos) – stopa prećživljavanja tokom embrionskog perioda.

Sve ove osobine računate su za svaki kohort posebno, odnosno, položena jaja od jedne ženke tokom jednog dana su uzimana za kohortu i srednje vrednosti analiziranih osobina izračunate su posebno za svaku kohortu.

### **Statističke analize**

Procena mortaliteta tokom embrionalnog perioda, izračunata je preko stopa preživljavanja na osnovu proporcije preživelih embriona između dva vremenska intervala. Interval poverenja stope preživljavanja je izračunat na osnovu formule:

$$CI = 2\sqrt{\frac{q(1-q)}{n}}$$

gde je  $q = 1-SR$ ,  $SR$  je stopa preživljavanja, a  $n$  je broj jaja na početku eksperimenta.

Stope preživljavanja su smatrane značajno različitim kada im se intervali poverenja ne preklapaju (Geller, 1983; Miaud, 1994).

Da bi se utrdio odnos između analiziranih odlika životne istorije kao i karakteristika ranog razvića, izračunat je Pirsonov koeficijent korelacije ovih osobina za svaku vrstu. Međusobni odnosi osobina životne istorije i razvića analizirani su preko njihovih međusobnih korelacija, formiranjem korelacionih matrica. Primenom Mantel testa moguće je utvrđivanje stepena podudarnosti između odgovarajućih matrica. Matrični koeficijent korelacije predstavlja koeficijent korelacije (Pirsonov koeficijent korelacije) između odgovarajućih elemenata dve matrice (Rolhf 2001). Vrednosti ovog koeficijenta kreću se između -1 i +1. Visoke negativne ili pozitivne korelacije ukazuju na visok stepen podudarnosti matrica koje se porede. Statistička značajnost matričnog koeficijenta korelacije testira se primenom Mantel testa. U ovom testu se, polazeći od pretpostavke (nulte hipoteze) da između poređenih matrica nema sličnosti, generiše veliki broj permutovanih matrica. Matrični koeficijent korelacija se izračunava između jedne originalne i niza permutovanih matrica u kojima su elementi matrice permutovani po principu slučajnosti. Na taj način dobija se niz vrednosti matričnih korelacija. Ukoliko vrednost matričnog koeficijenta korelacije

izračunatog za dve matrice koje se porede, u 95 % slučajeva prelazi vrednosti koeficijanta dobijenih permutovanjem jedne od matrica, nulta hipoteza se odbacuje. Za analizu podudarnosti u karakteristikama embrionskog razvića i rane životne istorije, polazeći od nulte hipoteze da između matrica dveju vrsta koje se porede nema sličnosti, slučajnim generisanjem novih matrica, sa 10000 ponavljanja testirano je da li su polazne matrice međusobno sličnije u poređenju sa slučajno generisanim matricama.

Pouzdanost dobijenih rezultata, kao i ponovljivost tih korelacionih matrica je dobijeno primenom metode ponovnog uzorkovanja sa ponavljanjem („Bootstrapping“ metod) (Cheverud i sar., 1989; Marroig i Cheverud, 2001). Metod se sastoji iz sledećeg: za svaku vrstu sa veličinom uzorka  $n$ ,  $n$  puta je napravljen novi uzorak sa promenjenim vrednostima u odnosu na originalni set podataka. Ovakva procedura je ponovljena 500 puta (Efron i Tibshirani, 1993) i napravljeno je 500 novih uzoraka podataka za svaku vrstu koristeći Poptools 2.62 (Hood, 2004). Za svih 500 novih setova podataka izračunate su korelacione matrice i poređene su sa korelacionom matricom dobijenom na osnovu originalnog seta podataka. Ponovljivost korelacionih matrica je korišćena za procenu teorijskog maksimuma korelacije matrica ( $R_{\max}$ ), kao i za dobijanje prosečne korelacije matrica ( $R_{\text{adj}}$ ) između dve analizirane matrice (Marroig i Cheverud, 2001). Vrednost  $R_{\max}$  je izračunata pomoću formule  $(t_A t_B)^{0.5}$ , gde su  $t_A$  i  $t_B$  srednje vrednosti matrice dobijene na osnovu korelacionih matrica **A** i **B**. Prosečna korelacija matrica ( $R_{\text{adj}}$ ) je izračunata kao količnik dobijene korelacije između dve matrice ( $R_{\text{obs}}$ ) i maksimalne korelacije matrica ( $R_{\max}$ ).

Razlike između vrsta u brzini razvića u određenim vremenskim intervalima analizirane su primenom neparametarskih statističkih metoda. Da bi se utvrdila razlika između vrsta u svakom vremenskom intervalu, primenjeni su Friedman test i Kruskal-Wallis test, a razlike između svakog para vrsta su testirane Mann-Whitney testom. Ove analize su rađene programom Statistika ver. 6.0.

### 2.3.3. Stopa rasta larvi

Za utvrđivanje razlika u larvenom razviću između vrsta, korišćeni su podaci dobijeni u laboratoriji Instituta za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Kragujevcu. U ovom eksperimentu sve četiri vrste velikih mrmoljaka su gajene u istim eksperimentalnim uslovima (eng. *common garden experiment*). Za ovaj eksperiment, ženke *T. macedonicus* su sakupljene na lokalitetu Đurđevac (44° 15`N, 20° 01`E, 250m, 5 ženki), vrsta *T. cristatus* je sakupljena na lokalitetu Miroč (44° 29`N, 22° 20`E, 440m, 6 ženki), vrsta *T. dobrogicus* je sakupljena u Oповu (45° 03`N, 20° 25`E, 67m, 6 ženki), a vrsta *T. arntzeni* na lokalitetu u blizini Pirota (April 2005, 43° 09' N, 22° 35' E, 367 m, 5 ženki). Sve ženke su sakupljene tokom ranog proleća, u martu i aprilu 2005. godine.

Radi utvrđivanja stope rasta larvi velikih mrmoljaka, larve su fotografisane sa razmernikom od 10mm odmah po izvaljivanju i zatim svakih 15 dana sve do metamorfoze. Vreme metamorfoze je određivano kada su im se škrge potpuno resorbovale i škržni otvori zatvorili. Fotografije su uzimane fotoaparatom marke Nikon Coolpix 4500. Merena je totalna dužina larvi programom za kompjutersku grafičku analizu UTHSCSA ImageTool 3.0. (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>), kao i standardna dužina tek metamorfoziranih jedinki digitalnim pomičnim merilom sa tačnošću od 0.01mm. Takođe je praćena i dužina trajanja larvenog perioda, tj. vreme od trenutka izvaljivanja pa do trenutka potpune metamorfoze.

#### **Statističke analize**

Da bi se procenila varijabilnost i utvrdile eventualne razlike između vrsta u navedenim karakteristikama, urađena je dvofaktorska analiza varijanse sa vrstom i srednjom vrednošću dužine larve za svaku analiziranu starost larve po vrstama kao faktorima. Za prosečnu veličinu larve uzimana je srednja vrednost larvi određene starosti (tek izvaljene larve, na svakih 15 dana do metamorfoze, metamorfozirane jedinke) koje su se izvalile u istom danu i koje je položila ista

ženka. Takođe, urađena je i kontrast analiza (post-hoc testovi) iz analize varijansi da bi se dobile razlike između svake vrste.

Za utvrđivanje razlika između vrsta u dužini trajanja larvenog perioda, urađena je analiza varijansi sa vremenom od trenutka izvaljivanja larve do njene metamorfoze kao faktorom.

Sve statističke analize su rađene u programu SAS (verzija 9.1.3., Institut 2006).

### **2.3.4. Ontogenija oblika tela**

Radi praćenja i analiziranja promene oblika tela tokom ontogenije velikih mrmoljaka, larve su fotografisane u staklenim komorama sa sistemom ogledala da bi se dobio lateralni izgled larve. Fotografisane su fotoaparatom marke Nikon Coolpix 4500 sa razmernikom od 10mm. Za ontogenetske promene u veličini i obliku, korišćeno je 5 različitih ontogenetskih stupnjeva u okviru 3 razvojna perioda:

1. **Larveni period** – larve starosti 75, 90 i 105 dana;
2. **Period metamorfoze** – od 7 do 10 dana pre potpune metamorfoze i
3. **Juvenilni period** – 7 dana nakon potpune metamorfoze, tj. posle potpune resorpcije škrge i zatvaranja škržnih otvora.

Larveni period započinje izvaljivanjem iz jajeta, i tokom larvenog perioda nastavlja se dalje razviće i diferencijacija. U studijama koje se bave razvićem kod repatih vodozemaca, stadijumi larvenog razvića određuju se preko stepena razvijenosti morfoloških struktura, pre svega ekstremiteta (Glücksohn, 1932). Za studiju ontogenije oblika larvi, kao polazna tačka uzete su larve starosti 75 dana jer su larvama tada potpuno formirani ekstremiteti, odnosno svi delovi ekstremiteta, i prema klasifikaciji baziranoj na morfološkoj diferencijaciji, ove larve su potpuno formirane. Zbog različite brojnosti larvi po kutijama (od 1 do 3), larve su izabrane metodom slučajnog uzorka i izabrano je po 20 jedinki svake vrste za svaki larveni stupanj.

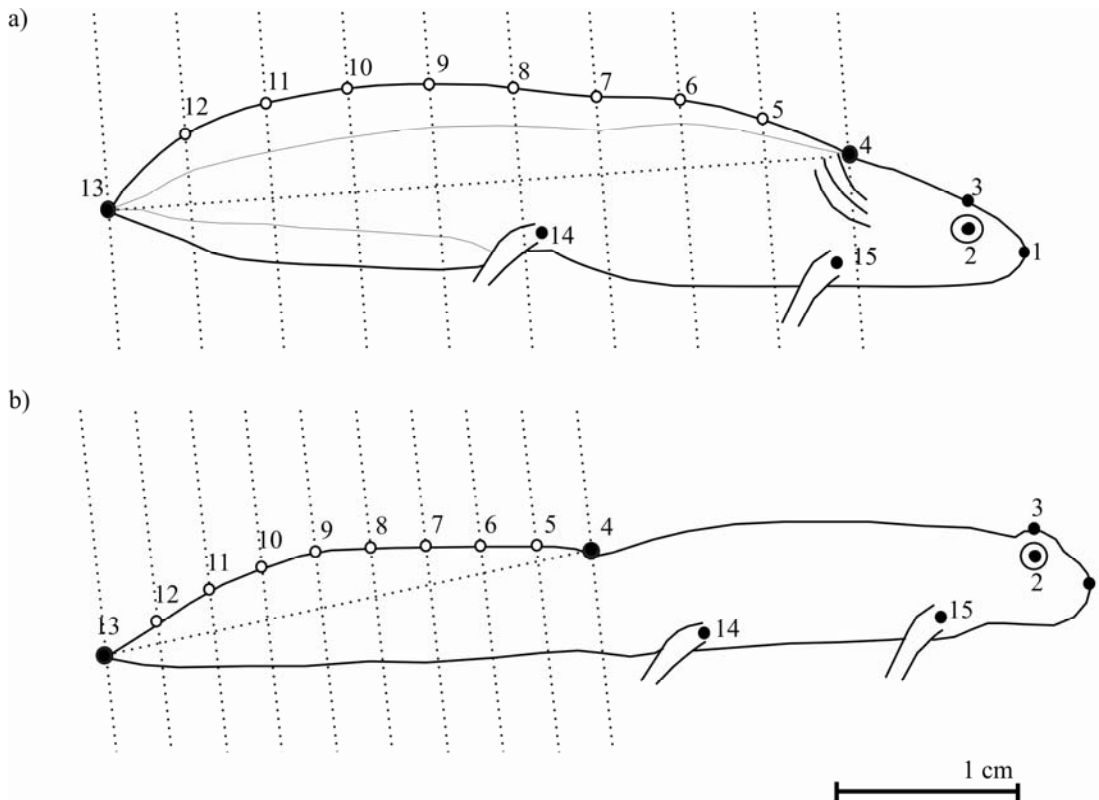
### **Statističke analize**

Za praćenje promene oblika tela larvi velikih mrmoljaka, primenjena je metoda geometrijske morfometrije (Zelditch i sar., 2000; Mitteroecker i Gunz, 2009). U geometrijskoj morfometriji, konfiguracija specifičnih tačaka opisuje oblik neke strukture. Specifične tačke su jasno definisane anatomske tačke koje je moguće utvrditi sa velikom tačnošću i ponovljivošću. Na osnovu anatomskih i geometrijskih kriterijuma, Bookstein (1991) daje pregled i specifikaciju specifičnih tačaka, pri čemu izdvaja tri osnovna tipa specifičnih tačaka. Prvom tipu pripadaju specifične tačke koje su definisane mestima susticanja različitih delova morfoloških celina (na primer, mesto susticanja dva ili više skeletnih elementa u glavenom skeletu, ili mesto susticanja dva ili više nerava u okviru nervature krila insekata). Ovom tipu tačaka pripadaju i jasno definisani centri nekih anatomskih struktura, kao što su centar zenice oka kičmenjaka. Drugom tipu pripadaju specifične tačke koje predstavljaju mesta najvećeg zakrivljenja (udubljenja, ispupčenja) određene anatomske strukture (npr. vrh zuba ili nastavka nekog skeletnog elementa). Trećem tipu pripadaju tačke koje takođe definišu ekstremne tačke, ali se mogu odrediti samo u odnosu na čitavu strukturu, odnosno objekat koji se analizira. Da bi se opisao oblik larvi i juvenilaca, korišćena je kombinacija od 7 specifičnih tačaka od čega najveći broj pripada drugom tipu prema bukštajnovoj klasifikaciji. Međutim, konstelacija ovih tačaka ne odražava oblik tela larvi i juvenilnih jedinki. Zbog toga, primenjena je analiza konstelacija specifičnih tačaka u kombinaciji sa takozvanim polu-specifičnim tačkama. Polu-specifične tačke su tačke koje opisuju oblik neke strukture između dve specifične tačke. Ove tačke ne pripadaju grupi jasno definisanih tačaka. Za njihovo definisanje neophodno je formiranje pomoćne mreže i koja je standardna za dati uzorak. U ovom slučaju, oblik leđnog i repnog nabora kod larvi, odnosno oblik repa kod juvenilnih jedinki, opisan je sa 8 polu-specifičnih tačaka. Kod juvenilnih jedinki, tačke koje opisuju oblik repa se razlikuju u odnosu na one kod larvi zbog resorpcije dorzalnog repnog peraja (njihove pozicije su date na slici 2.3.4.1.).



Polu-specifične tačke su definisane pomoću programa MakeFan6 tako što se na sliku stavi „češalj“ od odabranog broja linija koji počinje i završava se nekom homologom tačkom. Tako se obezbeđuje uniformnost u smeštanju polu-specifičnih tačaka na svim analiziranim jedinkama.

Putem programa TpsDig (Rohlf, 2005) digitalizovano je svih 15 dvodimenzionalnih tačaka.



**Slika 2.3.4.1.** Izbor tačaka i polu-specifičnih tačaka na lateralnom izgledu a) larvi od 75, 90 i 105 dana starosti i larvama u procesu metamorfoze i b) juvenilnih jedinki po metamorfozi: **1.** vrh njuške; **2.** centar oka; **3.** visina glave u nivou oka; **4.** početak dorzalnog repnog nabora; **5-12.** polu-specifične tačke koje predstavljaju oblik dorzalnog repnog nabora kod larvi i repa kod juvenilnih jedinki; **13.** vrh repa; **14.** položaj zadnjeg ekstremiteta i **15.** položaj prednjeg ekstremiteta.

Varijable oblika su izdvojene primenom generalizovane Prokrustove analize, (eng. Generalized Procrustes Analysis, GPA). Ova analiza (GPA) je najčešće primenjivana procedura u savremenim studijama geometrijske morfometrije. Prokrustovom analizom (Prokrustovom superimpozicijom, poravnavanjem) se skaliranjem, translacijom i rotacijom konfiguracija specifičnih tačaka eliminišu sve razlike uslovljene veličinom, položajem i orijentacijom. Time se zadržavaju samo informacije koje su direktno vezane za razlike u obliku (Rohlf i Slice, 1990; Bookstein, 1991). Superimpozicija polu-specifičnih tačaka vrši se po drugom algoritmu (Bookstein, 1997), i obavljena je u programu SemiLand6. Programi MakeFan6 i SemiLand6 pripadaju seriji IMP programa (Sheets, 2003). Polu-specifične tačke nemaju iste stepene slobode kao prave tačke i služe za opisivanje kriva (Bookstein, 1997).

U geometrijskoj morfometriji veličina centroida predstavlja meru veličine nekog objekta opisanog konfiguracijom specifičnih tačaka. Veličina centroida (eng. *centroid size*, CS) predstavlja kvadratni koren sume kvadriranih rastojanja svake tačke od težišta date konfiguracije tačaka. Veličina centroida korišćena je kao mera veličine i razlike u veličini između vrsta testirane su analizom varijanse, sa veličinom centroida kao zavisno promenljivom i vrstom kao faktorom.

Primena metoda geometrijske morfometrije omogućava vizualizaciju promena u obliku, odnosno razlika u obliku. Matematička osnova za vizualizaciju promena oblika između dve odgovarajuće konfiguracije specifičnih tačaka proizilazi iz fizičke metafore transformacija idealno tanke, beskonačne metalne ploče (engl. „*thin plate spline*“), ili kako se najčešće označava skraćenicom TPS (Bookstein 1991). Oblik i način deformacija tanke metalne ploče zavise od postojećih razlika u konfiguracijama specifičnih tačaka. Energija neophodna za deformaciju predstavlja osnovu za izračunavanje varijabli oblika (engl. *bending energy*). Visoke vrednosti energije deformacije označavaju lokalizovane promene oblika između blisko postavljenih tačaka, koje izazivaju lokalna zakrivljenja i deformaciju mreže, dok su niske vrednosti energije deformacije vezane za promene oblika koje su uslovljene promenama položaja većeg broja koordinata

koje dovode do promena većih razmera. Energija deformacije opisuje stepen lokalizovanosti promena. Energija deformacija beskonačno tanke metalne ploče daje matematičku podlogu koja omogućava izračunavanje varijabli oblika koje se mogu dalje koristiti u statističkim analizama.

Razlikuju se dve komponente varijabli oblika označene kao neuniformna i uniformna komponenta. Potpuni set varijabli oblika čine obe komponente, tj. parcijalne deformacije oblika (engl. *partial warps*), kao i uniformne promene oblika duž osa X i Y (UniX i UniY). Za analiziranje promene oblika, korišćene su sve varijable oblika, i uniformne i neuniformne komponente.

Da bi se utvrdila ontogenija oblika tela tokom larvenog perioda, analiziran je odnos između promene oblika i starosti larve, odnosno njihove veličine. Početna hipoteza je da se vrstama ne razlikuju ontogenetske putanje u promenama oblika tela. Podaci za sva tri larvena stupnja (75, 90 i 105 dana stare larve) su grupisani. Multivarijantnom analizom kovarijanse (MANCOVA) se testirala podudarnost nagiba svih varijabli oblika pri čemu je veličina (CS) bila kovarijanta i pri čemu statistička značajnost interakcije između veličine i vrste ukazuje na postojanje razlika u specifičnim alometrijskim nagibima za analizirane vrste.

Da bi se utvrdile razlike između vrsta u obliku larvi za svaki larveni stupanj, urađena je kanonijska diskriminantna analiza kao i vizuelizacija promena oblika između vrsta u programu CVAgen6 (IMP serija; Sheets, 2003).

Za analizu stope promena tokom larvenog razvića korišćene su Prokrustasove distance svake jedinke u odnosu na tri najmanje jedinke za svaku vrstu kao pokazatelj količine promene oblika tokom razvića (Zelditch i sar., 2000; Ivanović i sar., 2007). Stope promene oblika za svaku vrstu su dobijene regresijom izračunatih Prokrustasovih distanci u odnosu na meru veličine (CS) koristeći program Regress6k (IMP; Sheets, 2003). Poređenje tako dobijenih stopa promena između vrsta je rađeno primenom II tipa regresije, modelom standardizovanih osa (Warton i sar., 2006) u programu SMATR, verzija 2.0. (Falster i sar., 2006).

Za određivanje unutargrupne varijanse u promeni oblika tela larvi, merene su varijansa i standardna greška za tu varijansu za svaki stupanj larvenog razvića. Vrednosti su dobijene upotrebom programa DisparityBox (IMP; Sheets, 2003) sa 900 ponavljanja.

Sve statističke analize su rađene u programima Statistika (verzija 6.0.) i SAS (verzija 9.1.3., Institut 2006).

### **3. REZULTATI I DISKUSIJA**

### 3.1. POGLAVLJE I: Karakteristike jaja

#### Rezultati publikovani u:

Furtula M, Ivanović A, Džukić G, Kalezić ML (2008) Egg size variation in crested newts from the western Balkans (Caudata: Salamandridae: *Triturus cristatus* Superspecies). **Zoological Studies** 47(5): 585-590.

Veličina jaja i fekunditet kod vodozemaca se razlikuju između taksona (Kaplan i Salthe, 1979), između različitih populacija iste vrste (npr. Kalezić i sar., 1994), kao i između ženki iste populacije (npr. Rafińska, 1991). Da bi se utvrdio stepen varijabilnosti i uticaj navedenih faktora na varijabilnost i eventualne razlike u veličini jaja urađena je dvofaktorska analiza varijanse sa populacijama i ženkama unutar populacija kao faktorima, za svaku od analiziranih karakteristika jaja. Kao što je već navedeno, analizirane su zapremina vitelusa i odnos zapremina vitelusa i galertnog omotača. Dobijeni rezultati su predstavljeni u tabeli 3.1.1. Da bi se utvrdio odnos varijabilnosti između populacija unutar vrsta u odnosu na varijabilnost i razlike u srednjim vrednostima između vrsta, urađena je i dvofaktorska analiza varijanse sa vrstama i populacijama kao faktorima (tabela 3.1.1). Pošto su dobijene razlike između vrsta mnogo veće nego između populacija, dalje analize karakteristika jaja su rađene na grupisanim podacima za svaku vrstu. Za vrstu *T. arntzeni* su bili dostupni podaci samo za jednu populaciju pa je pretpostavljeno da u okviru ove vrste postoji isti obrazac unutar specijskog variranja karakteristika jaja između populacija i ženki kao i kod preostale tri vrste velikih mrmoljaka.

Za zapreminu vitelusa je dobijeno da se vrste međusobno statistički razlikuju (ANOVA, kontrast analiza,  $p < 0.0001$ ) osim između *T. macedonicus* i *T. arntzeni*. Najmanje zapremine vitelusa imala je vrsta *T. dobrogicus* (SV) srednja vrednost je bila  $1.926\text{mm}^3$  i SD (standardna devijacija)  $0.423\text{mm}^3$ , zatim *T. cristatus* (SV =  $3.502\text{mm}^3$  i SD =  $0.782\text{mm}^3$ ) i sa najvećim zapreminama vitelusa vrste *T. arntzeni* (SV =  $5.002\text{mm}^3$ , SD =  $1.023\text{mm}^3$ ) i *T. macedonicus* (SV =  $5.022\text{mm}^3$  i SD =  $0.998\text{mm}^3$ ). Za odnos između zapremina galertnog omotača i vitelusa dobijeno je da se vrste međusobno statistički razlikuju (ANOVA, kontrast analiza,  $p < 0.0001$ ). Najmanji odnos zapremine galertnog omotača i vitelusa imala je vrsta *T. macedonicus* (SV = 2.829 i SD = 0.648), zatim *T. arntzeni* (SV = 3.508 i SD = 0.796) i *T. cristatus* (SV = 4.132 i SD = 1.150), dok je najveći odnos imala vrsta *T. dobrogicus* (SV = 4.753 i SD = 1.430) (Prilog 1.).

**Tabela 3.1.1.** Rezultati dvofaktorske analize varijansi za zapreminu vitelusa i odnosa zapremina galernog omotača i vitelusa za analizirane vrste velikih mrmoljaka.

Varijabla	Vrsta	Faktor	d.f.	MS	F	p
<b>Zapremina vitelusa</b>						
	<i>T. macedonicus</i>	Populacija	2	0.8554	157.27	***
		Ženka (populacija)	4	0.3453	63.49	***
	<i>T. cristatus</i>	Populacija	1	0.0376	6.93	**
		Ženka (populacija)	10	0.1388	25.62	***
	<i>T. dobrogicus</i>	Populacija	1	1.7272	191.9	***
		Ženka (populacija)	9	0.3198	35.53	***
	Grupisani podaci	Vrsta	2	13.5647	1545.67	***
		Populacija (vrsta)	4	2.842	323.84	***
<b>Galerni omotač/vitelus</b>						
	<i>T. macedonicus</i>	Populacija	2	0.6065	85.62	***
		Ženka (populacija)	4	0.4126	58.25	***
	<i>T. cristatus</i>	Populacija	1	0.0968	8.68	**
		Ženka (populacija)	10	0.0922	8.27	***
	<i>T. dobrogicus</i>	Populacija	1	0.0078	0.63	nz
		Ženka (populacija)	9	0.2692	21.64	***
	Grupisani podaci	Vrsta	2	7.625	973.34	***
		Populacija (vrsta)	4	0.417	36.83	***

nz - nije značajno,  $p > 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



Dobijen je i statistički značajan odnos primenom modela standardizovanih osa između veličine ženke i zapremine vitelusa ( $r^2 = 0.295$ ,  $p = 0.0023$ ) što ukazuje da veće ženke polažu i jaja sa većim vitelusom. Pri tome nije dobijena statistička značajnost za odnos između veličine ženke i odnosa zapremina galertnog omotača i vitelusa ( $r^2 = 0.035$ ,  $p = 0.335$ ). Model standardizovanih osa je pokazao da analizirane vrste imaju isti nagib prave koja opisuje alometrijski odnos veličine jaja u odnosu na veličinu ženke. Jedino se vrste razlikuju u visini nagiba, tj. u veličini jaja (Tabela 3.1.2.). U odnosu na veličinu ženke, vrsta *T. dobrogicus* ima najmanja jaja u poređenju sa ostalim vrstama ( $p < 0.0001$ ; u odnosu na *T. cristatus*  $p = 0.0217$ ). Jaja vrste *T. cristatus* su takođe bila manja u poređenju sa vrstama *T. arntzeni* ( $p = 0.0003$ ) i *T. macedonicus* ( $p = 0.0157$ ).

**Tabela 3.1.2.** Rezultati regresije između zapremine vitelusa i veličine ženki za sve analizirane vrste velikih mrmoljaka. Nagib, **Ho**: homogeni nagibi ( $p$ ); Visina (odsečak) **Ho**: nema razlike u visini nagiba ( $p$ ); Položaj duž nagiba (položaj na X) **Ho**: nema razlika u položaju u odnosu na X osu ( $p$ ).

X i Y	Vrsta	n	$r^2$	$p$	Nagib	Odsečak (Y)	Nagib (p)	Visina (p)	Položaj duž nagiba (p)
Zapremina vitelusa i SVL ženki	<i>T. macedonicus</i>	7	0.160	0.373	2.26	-3.50	nz	***	***
	<i>T. cristatus</i>	12	0.048	0.495	2.02	-3.19			
	<i>T. dobrogicus</i>	5	0.065	0.679	-1.10	2.22			
	<i>T. arntzeni</i>	5	0.047	0.727	-4.46	8.83			

nz, - nije značajno,  $p > 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### **Species-specifični odnosi veličine vitelusa i galernog omotača kod velikih mrmoljaka**

Iz dobijenih rezultata proizilazi da je veličina jaja kod velikih mrmoljaka odlika životne istorije koja je specifična za svaku vrstu. Iako postoje razlike u karakteristikama jaja između populacija kao i između ženki unutar populacija, utvrđeno je da najveće razlike postoje između vrsta. Tako vrsta *T. dobrogicus* ima najmanji vitelus, a najveći odnos zapremina galernog omotača i vitelusa, vrste *T. arntzeni* i *T. macedonicus* imaju suprotan odnos za ove osobine. Kod njih je u odnosu na *T. dobrogicus* i *T. cristatus* vitelus najveći, a odnos galerta/vitelus najmanji. Po veličini vitelusa i odnosu galerta/vitelus, vrsta *T. cristatus* nalazi se između *T. dobrogicus*, sa jedne strane i *T. arntzeni* i *T. macedonicus* sa druge strane (Tabela 3.1.3.).

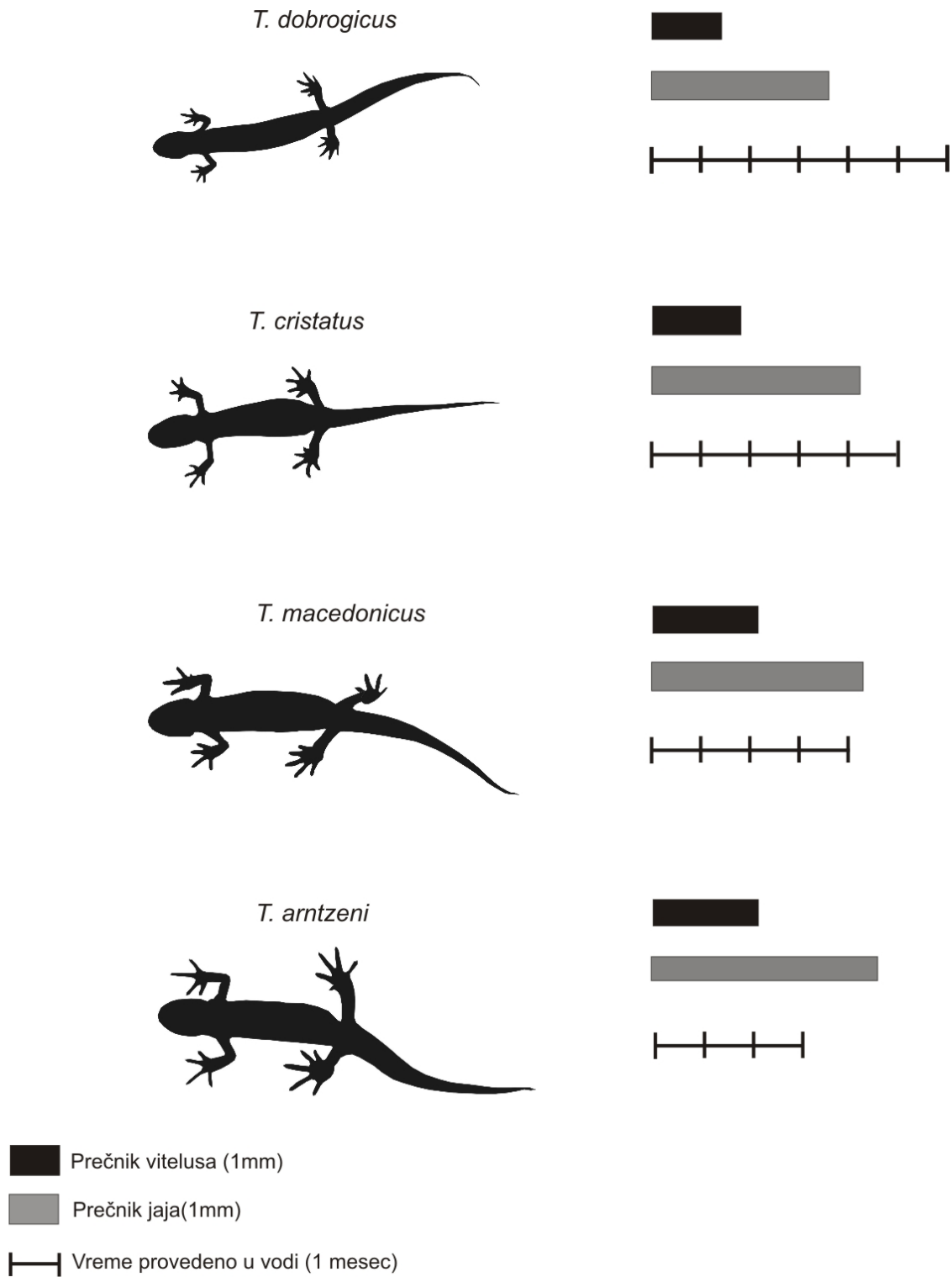
**Tabela 3.1.3.** Deskriptivna statistika mera jaja za četiri vrste analiziranih velikih mrmoljaka. N – broj jaja, SV – srednja vrednost, SD – standardna devijacija, CV – koeficijent varijacije.

Vrsta	N	Dužina galerte			Širina galerte			Prečnik vitelusa		
		SV	SD	CV %	SV	SD	CV %	SV	SD	CV %
<i>T. macedonicus</i>	1336	4.252	0.415	9.76	2.484	0.187	7.53	2.116	0.139	6.57
<i>T. cristatus</i>	371	4.112	0.403	9.80	2.531	0.209	8.26	1.874	0.137	7.31
<i>T. dobrogicus</i>	876	3.585	0.498	13.89	2.276	0.271	11.91	1.604	0.209	13.03
<i>T. arntzeni</i>	450	4.623	0.323	6.99	2.642	0.188	7.12	2.113	0.142	6.72

Veličina vitelusa predstavlja materinsko reproduktivno ulaganje (Duellman i Trueb, 1994) i korelisana je sa veličinom ženke. Analizirane vrste imaju isti alometrijski nagib za veličinu vitelusa i veličinu tela ženke. Međutim, ovakva podudarnost nije dobijena za odnos veličine tela i odnosa veličine galernog

omotača i vitelusa. Jedan od faktora koji može da objasni razlike u odnosu zapremina galernog omotača i vitelusa, kao veličine koja nije korelisana sa veličinom ženke, je i ekološki faktor, tačnije tip staništa u kojima ove vrste žive. *Triturus dobrogicus* naseljava veća otvorena vodena staništa, pa čak i sporotekuće vode u ravničarskim delovima i provodi i do 6 meseci u vodi (Arntzen i Wallis, 1999). Neke od funkcija galernog omotača su da štite embrion od isušivanja, UVB zračenja, mehaničkih povreda (Duellman i Trueb, 1994). Tako jedinke podunavskog mrmoljka ne moraju da ulažu u stvaranje većeg omotača jer takvim staništima ne preči isušivanje. Za razliku od podunavskog mrmoljka, vrste *T. arntzeni* i *T. macedonicus* naseljavaju manje efemerne bare na višim nadmorskim visinama i za njih je bitno da naprave veći omotač da bi embrion imao veću šansu za opstanak i zbog isušivanja bara, kao i zbog povećanog UVB zračenja na većim nadmorskim visinama (Adams i sar., 2001; Palen i sar., 2005). Vreme koje oni provedu u vodi godišnje je od 3 do 4 meseca. Vrsta *T. cristatus* je i po tipu staništa i vremenu koje provede u vodi između ovih pomenutih vrsta (Arntzen i Wallis, 1999) (slika 1.2.3.).

Iz ovih rezultata se može zaključiti da karakteristike jaja, kao jedna od odlika životne istorije, prate opštu pravilnost klinalnog „rasporeda” vrednosti fenotipskih odlika kod velikih mrmoljaka (na jednom kraju kline se nalazi vrsta *T. dobrogicus*, na drugom, vrste *T. arntzeni* i *T. macedonicus*, a između je vrsta *T. cristatus*). Pretpostavka je da su adaptivne promene podunavskog mrmoljka vezane za tip staništa nastale za vreme evolucije velikih mrmoljaka (Crnobrnja-Isailović i sar., 1997; Arntzen i sar., 2007) i da su promene u karakteristikama jaja išle paralelno sa promenama u morfologiji i ekologiji ovih vrsta.



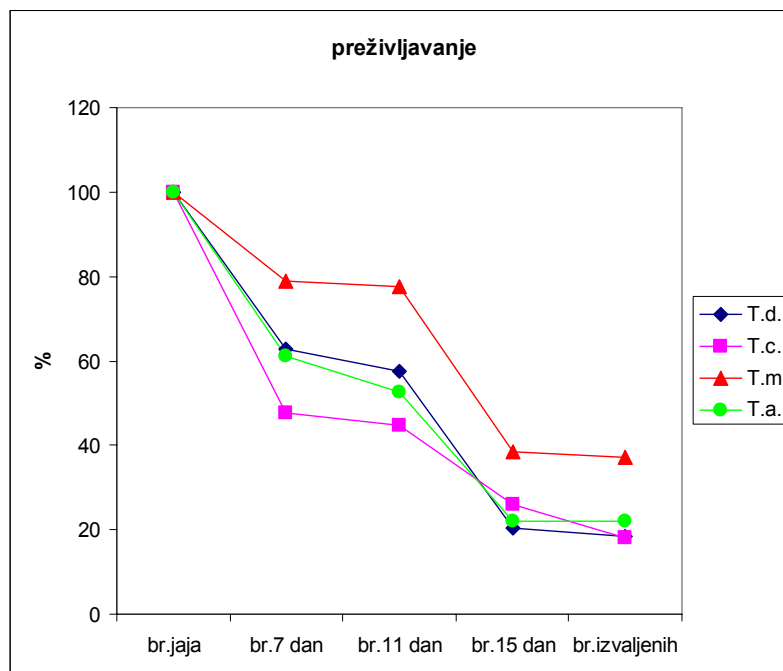
**Slika 3.1.1.** Morfotipovi, prosečne mere jaja i vreme provedeno u vodi godišnje za analizirane vrste velikih mrmoljaka.

### 3.2. POGLAVLJE II: Embrionsko razviće

#### **Rezultati publikovani u:**

**Cvijanović M, Ivanović A, Tomašević-Kolarov N, Džukić G, Kalezić ML (2009)** Early ontogeny shows the same interspecific variation as natural history parameters in the crested newt (*Triturus cristatus* superspecies) (Caudata, Salamandridae). **Contributions to Zoology**, 78: 43-50.

Embrionsko razviće velikih mrmoljaka je do sada nedovoljno istraživano (Griffiths i Wijer, 1994; D'Amen i sar., 2007; Litvinchuk i sar., 2007), pogotovo kada se radi o komparativnoj embriologiji, tj. o razlikama između vrsta u stadijumima i brzini razvića. U ovoj disertaciji su poređena embrionska razvića četiri vrste velikih mrmoljaka, kao i načini korelacija odlika životne istorije između analiziranih vrsta. Da bi se utvrdile i kvantifikovale karakteristike rane životne istorije analizirano je osam karakteristika životne istorije i ranog embrionskog razvića.



**Slika 3.2.1.** Preživljavanje embriona analiziranih vrsta od trenutka polaganja jaja do izvaljivanja larvi.

Jedna od ključnih karakteristika životne istorije je stopa preživljavanja. Stopa preživljavanja praćena je od trenutka polaganja jaja do izvaljivanja. Postoji velika razlika između broja položenih jaja i broja embriona koji su dostigli stadijum neurule, tj. embrioni stari 7 dana. Međutim, najveći mortalitet embriona je zabeležen kod embriona starosti između 11 i 15 dana (na preseku između S11

i S15) kod svih analiziranih vrsta. Visok mortalitet u ovom stadijumu je rezultat delovanja tzv. balansnog letalnog sistema, tj. homomorfizma heteromorfnog hromozoma (Sims i sar., 1984). Dobijena stopa mortaliteta u tom periodu je bila oko 50% kod svih vrsta velikih mroljaka, što se slaže i sa do sada već objavljenim podacima (D'Amen i sar., 2006). Nije pronađena razlika u stopama preživljavanja između vrsta *T. dobrogicus*, *T. cristatus* i *T. arntzeni*, dok je vrsta *T. macedonicus* imala mnogo veću stopu preživljavanja u odnosu na ostale vrste (Slika 3.2.1.). Vrednosti stopa preživljavanja između svakog vremenskog preseka kao i ukupna stopa preživljavanja za sve vrste date su u tabeli 3.2.1.

**Tabela 3.2.1.** Stope preživljavanja (SR) i intervali poverenja stopa preživljavanja (CI) embriona analiziranih vrsta velikih mrmoljaka između svakog vremenskog intervala.

Stopa preživljavanja	<i>T. macedonicus</i>		<i>T. arntzeni</i>		<i>T. dobrogicus</i>		<i>T. cristatus</i>	
	SR	CI	SR	CI	SR	CI	SR	CI
na 7. danu	0.79	0.76-0.82	0.61	0.55-0.67	0.39	0.35-0.43	0.47	0.39-0.55
između 7. i 11. dana	0.98	0.97-0.99	0.86	0.81-0.91	0.95	0.93-0.98	0.94	0.88-0.99
između 11. i 15. dana	0.49	0.46-0.53	0.42	0.34-0.50	0.54	0.48-0.60	0.58	0.45-0.70
između 15. dana i izvaljivanja	0.97	0.95-0.99	1	/	0.9	0.85-0.95	0.7	0.55-0.85
<b>ukupna stopa preživljavanja</b>	<b>0.37</b>	<b>0.15-0.21</b>	<b>0.22</b>	<b>0.17-0.27</b>	<b>0.18</b>	<b>0.15-0.21</b>	<b>0.18</b>	<b>0.12-0.25</b>

Razlike u brzini embrionskog razvića između vrsta (Slika 3.2.2.) testirane su Kruskal-Wallis neparametarskim testom. Odnosno, poređeni su stupnjevi u razviću dostignuti u određenim vremenskim presecima (na sedmom [S7], jedanestom [S11] i petnaestom danu [S15] embrionskog razvića). Značajne razlike u brzini razvića između vrsta su nađene na svim vremenskim presecima (na 7. danu:  $H = 131.05$ ,  $p < 0.0001$ ; na 11 danu:  $H = 97.34$ ,  $p < 0.0001$ ; i na 15. danu:  $H = 81.52$ ,  $p < 0.0001$ ). Poređeni su i embrionalni stadijumi između svake

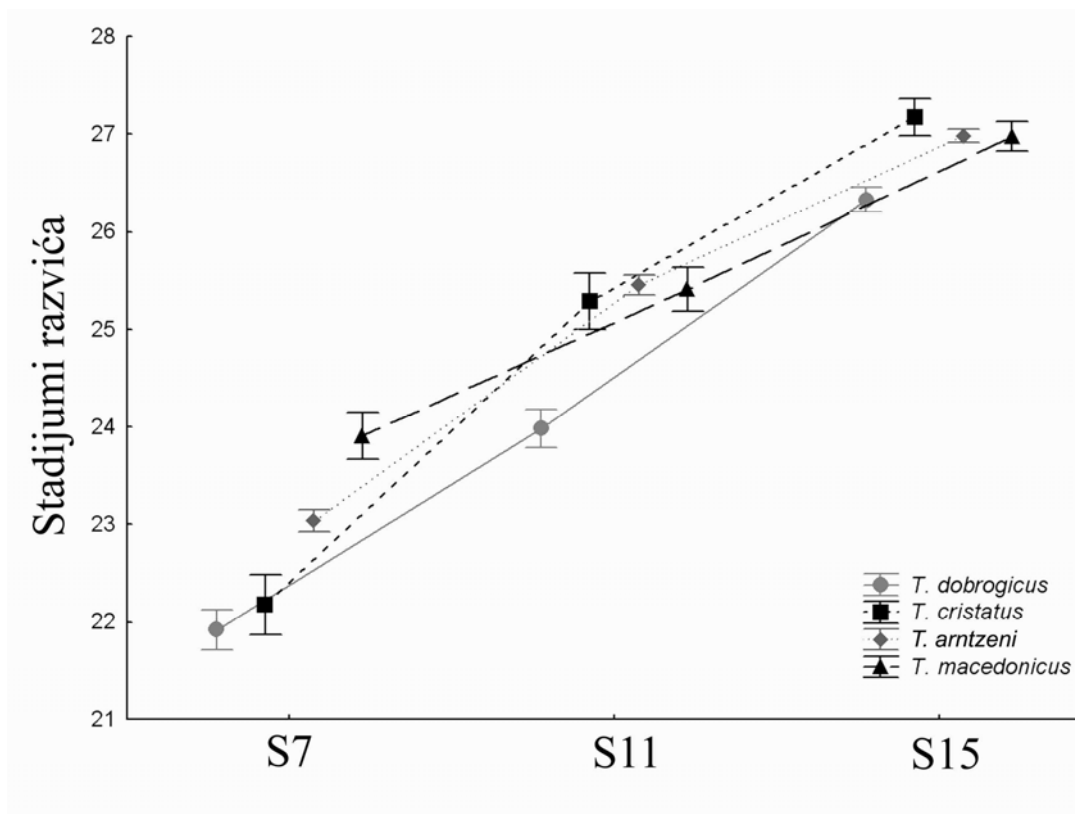
vrste na svakom vremenskom preseku Mann-Whitney testom. Rezultati pokazuju da se na ranijim stadijumima (na 7. danu) sve vrste međusobno razlikuju, dok se u kasnijem razviću jedino vrsta *T. dobrogicus* razlikuje u odnosu na preostale tri analizirane vrste velikih mrmoljaka. Rezultati poređenja vrsta su predstavljeni u tabeli 3.2.2.

**Tabela 3.2.2.** Poređenje embrionskih stadijuma na svim vremenskim presecima (S7, S11 i S15) između vrsta. Statistički značajne razlike između vrsta su predstavljene debljim linijama.

Poređene vrste	S7		S11		S15	
	U	P	U	P	U	P
<i>T. macedonicus</i> - <i>T. arntzeni</i>	<b>686.5</b>	0.0001	1744.0	0.4400	1212.0	0.8600
<i>T. macedonicus</i> - <i>T. dobrogicus</i>	<b>365.5</b>	0.0001	<b>421.5</b>	0.0001	<b>969.0</b>	0.0001
<i>T. macedonicus</i> - <i>T. cristatus</i>	<b>345.5</b>	0.0001	587.0	0.1800	587.0	0.1800
<i>T. arntzeni</i> - <i>T. dobrogicus</i>	<b>2.5</b>	0.0001	<b>160.0</b>	0.0001	<b>205.5</b>	0.0001
<i>T. arntzeni</i> - <i>T. cristatus</i>	<b>10.0</b>	0.0001	281.0	0.7600	123.5	0.2400
<i>T. dobrogicus</i> - <i>T. cristatus</i>	261.5	0.0465	<b>110.5</b>	0.0001	<b>157.0</b>	0.0001

Srednje vrednosti, standardne devijacije i koeficijenti variranja ranih odlika životne istorije velikih mrmoljaka su dati u tabeli 3.2.3. Utvrđen je obrazac korelacija između istraživanih odlika životne istorije, kao i određenih embrionskih stadijuma (ukupno jedanaest karakteristika) na svakom vremenskom preseku tokom embrionskog razvića. Izračunati su koeficijenti korelacija između svih osobina, odnosno, formirane su korelacione matrice (11 x 11) za svaku vrstu ponaosob (Tabela 3.2.4.).





**Slika 3.2.2.** Stadijumi razvića svih analiziranih vrsta velikih mrmoljača na tri različita vremenska preseka tokom embrionskog razvića.

Iako je korelaciona matrica za vrstu *T. cristatus* izračunata na osnovu manjeg broja kohorti (samo 19 kohorti), utvrđeno je da su matrice ponovljive i pouzdane kod sve četiri analizirane vrste (Tabela 3.2.5.). Interesantno je, da nije dobijena korelacija između vremena kada su jaja polagana za vreme ovipozicije i broja položenih jaja osim kod vrste *T. dobrogicus* gde je ta korelacija pozitivna. Takođe, nije dobijena ni korelacija između broja položenih jaja i veličine vitelusa ni kod jedne analizirane vrste. Značajna negativna korelacija je dobijena između veličine vitelusa i trajanja embrionskog perioda samo kod vrste *T. macedonicus*. Kod svih vrsta osim kod *T. cristatus* je dobijena značajna pozitivna korelacija između veličine tek izvaljenih larvi i dužine trajanja embrionskog perioda.

**Tabela 3.2.3.** Srednje vrednosti (SV), standardne devijacije (SD) i koeficijenti variranja (CV) za analizirane rane odlike životne istorije velikih mrmoljaka za ukupan broj jaja odnosno larvi (N).

Odlika životne istorije	<i>T. macedonicus</i>			<i>T. arntzeni</i>			<i>T. dobrogicus</i>			<i>T. cristatus</i>		
	N	SV ± SD	CV %	N	SV ± SD	CV %	N	SV ± SD	CV %	N	SV ± SD	CV %
Prečnik vitelusa (mm)	857	1.95±0.38	19.31	293	1.87±0.12	6.25	657	1.55±0.07	4.7	143	1.87±0.15	7.83
Zapremina galerte (mm <sup>3</sup> )	857	9.87±1.76	17.8	293	7.53±2.39	31.73	657	6.59±1.86	28.2	143	11.51±4.47	38.8
TL izvaljenih larvi (mm)	319	11.36±0.64	5.67	65	9.70±0.29	3.03	126	9.25±0.57	6.12	26	9.97±0.71	7.1
Embrionalni period (dani)	319	20.01±1.51	7.55	65	16.96±1.36	8.04	126	26.10±1.44	5.51	26	21.80±2.18	10.0

**Tabela 3.2.4.** Pirsonovi koeficijenti korelacija između 11 analiziranih odlika životne istorije i embrionalnog razvića velikih mrmoljaka: a) *T. macedonicus*, 91 kohorta (gornja dijagonala); *T. arntzeni*, 34 kohorte, (donja dijagonala); b) *T. cristatus*, 19 kohorti, (gornja dijagonala); *T. dobrogicus*, 76 kohorti, (donja dijagonala). Statistički značajni koeficijenti korelacije ( $p < 0.05$ ) su predstavljeni debljim brojevima. Skraćenice su objašnjene u delu Materijal i metode.

a)

	DO	NE	RV	VG	S7	S11	S15	NH	TL	EP	V
DO		-0.13	<b>-0.38</b>	<b>0.54</b>	<b>0.54</b>	0.18	<b>0.24</b>	0.07	-0.04	<b>-0.36</b>	0.22
NE	-0.17		0.12	0.15	0.09	-0.07	0.07	<b>0.74</b>	0.00	-0.10	<b>-0.27</b>
RV	0.42	-0.18		-0.12	0.14	-0.02	0.02	-0.02	0.01	-0.19	-0.20
VG	<b>-0.55</b>	0.43	0.03		<b>0.53</b>	0.03	0.01	0.21	-0.02	<b>-0.39</b>	0.03
S7	0.17	0.18	<b>0.53</b>	0.28		<b>0.38</b>	<b>0.36</b>	<b>0.35</b>	0.03	<b>-0.44</b>	<b>0.24</b>
S11	0.21	-0.16	0.34	0.11	0.52		<b>0.67</b>	0.20	0.00	<b>-0.32</b>	0.17
S15	<b>0.70</b>	0.04	0.34	-0.32	0.09	0.08		0.18	0.07	<b>-0.33</b>	0.14
NH	0.11	<b>0.61</b>	-0.06	0.00	0.40	0.28	0.23		-0.06	-0.19	0.23
TL	-0.46	-0.17	-0.41	0.15	-0.29	0.24	-0.32	-0.22		<b>0.61</b>	-0.03
EP	<b>-0.70</b>	0.02	<b>-0.64</b>	0.31	<b>-0.62</b>	-0.20	<b>-0.53</b>	-0.34	<b>0.66</b>		-0.11
V	0.30	-0.46	-0.19	<b>-0.57</b>	<b>-0.49</b>	0.26	0.07	0.05	0.21	0.13	

b)

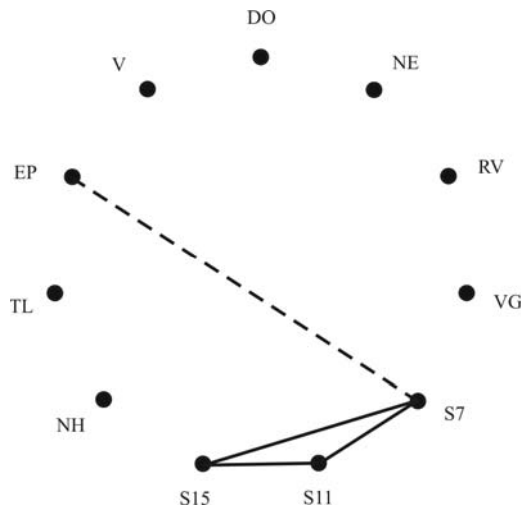
	DO	NE	RV	VG	S7	S11	S15	NH	TL	EP	V
DO		-0.50	0.21	-0.04	0.13	0.47	0.28	-0.63	0.38	-0.02	-0.33
NE	<b>0.62</b>		-0.33	0.37	0.38	-0.01	0.03	0.59	-0.52	-0.69	-0.29
RV	0.14	-0.24		0.17	0.29	0.11	0.43	-0.44	0.52	-0.08	-0.01
VG	0.42	0.42	-0.07		0.11	-0.13	0.37	0.14	-0.08	-0.34	-0.36
S7	-0.22	-0.38	0.27	-0.38		<b>0.82</b>	<b>0.78</b>	0.19	0.22	<b>-0.88</b>	0.10
S11	<b>-0.50</b>	-0.32	0.24	-0.14	0.24		<b>0.76</b>	0.12	0.50	-0.56	0.27
S15	0.36	0.07	0.28	0.09	0.23	0.21		0.22	0.62	-0.60	0.33
NH	-0.11	<b>0.53</b>	<b>-0.50</b>	0.33	-0.34	0.05	-0.32		0.05	-0.25	0.52
TL	-0.08	-0.28	0.32	-0.38	0.02	-0.08	-0.13	-0.24		0.14	0.54
EP	-0.31	-0.40	0.25	-0.36	0.05	0.09	-0.27	-0.09	<b>0.77</b>		0.20
V	<b>-0.63</b>	-0.37	-0.38	-0.02	0.04	0.32	-0.40	<b>0.48</b>	-0.10	0.19	

Korišćenjem Mantel testa za analizu korelacionih matrica između vrsta, dobijeno je da se korelacije odlika životne istorije *T. cristatus* ne razlikuju od obrasca variranja tih odlika kod *T. dobrogicus* ( $R = 0.597$ ,  $p < 0.05$ ), ali se razlikuje u odnosu na preostale dve vrste. Korelacija odlika vrste *T. dobrogicus* podudara se sa korelacijama odlika *T. macedonicus* ( $R = 0.688$ ,  $p < 0.05$ ), dok poređenjem matrica između *T. dobrogicus* i *T. arntzeni* nije dobijena statistička značajnost ( $R = 0.266$ ,  $p > 0.05$ ), odnosno ne postoji podudarnost u obrascima korelacija analiziranih osobina te dve vrste. Obrazac korelacija kod *Triturus arntzeni* ne razlikuje se od obrazca korelacija jedanaest analiziranih odlika *T. macedonicus* ( $R = 0.450$ ,  $p < 0.05$ ), dok se od preostalih analiziranih vrsta razlikuje. Načini korelacija odlika životnih istorija i embrionskih stadijuma su grafički predstavljeni na slici 3.2.3.

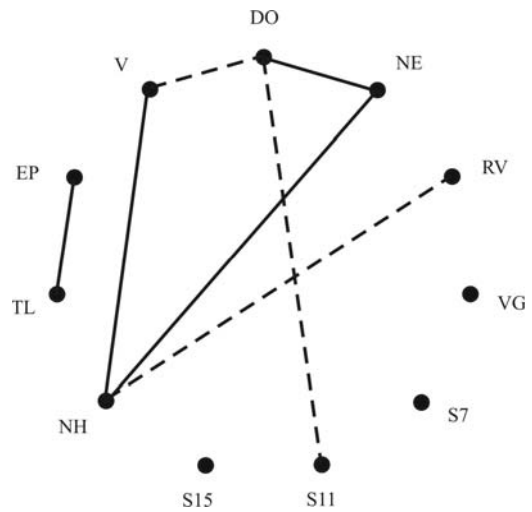
**Tabela 3.2.5.** Rezultati poređenja korelacionih matrica između vrsta.  $R_{obs}$  – dobijeni koeficijent korelacije između matrica;  $R_{max}$  – maksimalni koeficijent korelacije između dve matrice;  $R_{adj}$  – korigovan koeficijent korelacije između dve matrice. Pouzdanost je testirana Mantel testom sa 10000 ponavljanja. Polazna hipoteza je da ne postoji sličnost između matrica koje se porede. Vrednosti sa zvezdicama ukazuju na sličnost matrice ( $p < 0.05$ ).

Poređene vrste	$R_{obs}$	$R_{max}$	$R_{adj}$
<i>T. macedonicus</i> - <i>T. arntzeni</i>	0.465*	0.889	0.522
<i>T. macedonicus</i> - <i>T. dobrogicus</i>	0.304*	0.892	0.341
<i>T. macedonicus</i> - <i>T. cristatus</i>	0.52*	0.804	0.646
<i>T. arntzeni</i> - <i>T. dobrogicus</i>	0.189	0.851	0.222
<i>T. arntzeni</i> - <i>T. cristatus</i>	0.398*	0.767	0.519
<i>T. dobrogicus</i> - <i>T. cristatus</i>	0.327*	0.77	0.424

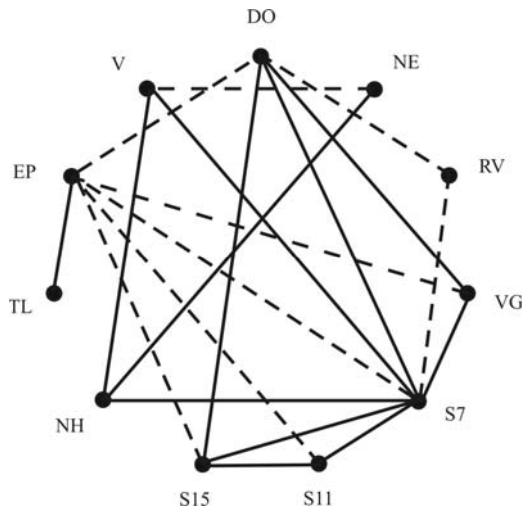
*T. cristatus*



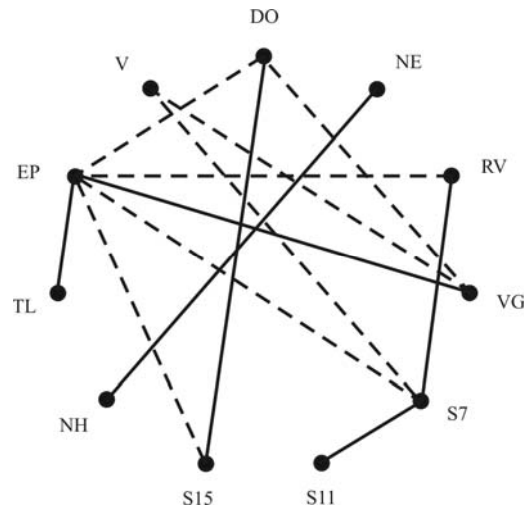
*T. dobrogicus*



*T. macedonicus*



*T. arntzeni*



**Slika 3.2.3.** Shematski prikaz korelacionih matrica istraživanih odlika životne istorije i embrionalnog razvića za svaku analiziranu vrstu. Pune linije predstavljaju pozitivne korelacije, dok isprekidane linije predstavljaju negativne korelacije.

## **Različiti obrasci međusobnih odnosa osobina rane životne istorije i embrionskog razvića velikih mrmoljaka**

Od filogenetski srodnih vrsta „očekuje se” da imaju fenotipske sličnosti, uključujući i sličnost u odlikama razvića. Kada se razlike u morfologiji i odlikama životne istorije dogode u okviru monofiletskih grupa, onda je najverovatniji razlog tih promena u različitim ekološkim zahtevima vrsta (Hansen i Martin, 1996; Klingenberg, 2004; Revell i sar., 2008). Jedan od primera ovakvih grupa je i grupa *Triturus cristatus* superspecies.

Iako je embrionsko razviće velikih mrmoljaka slično u pogledu razvojnih stadijuma i stopi preživljavanja, analizirane vrste se razlikuju u stopama razvića i korelacijama ranih odlika životne istorije i razvića. Vrsta koja se jasno odvađa od ostalih je *T. dobrogicus*, posebno u poređenju sa vrstama *T. macedonicus* i *T. arntzeni*, sa dužim embrionskim periodom i različitim vremenima pojavljivanja određenih morfoloških odlika. Razlike u vremenima pojavljivanja određenih razvojnih stadijuma, kao i u stopi razvića, se smatraju za uzročnike nastajanja fenotipskih razlika između srodnih vrsta tokom evolucije (Ridley, 2003). Moguće je zato da heterohronične promene tokom rane ontogenije dovode do odvajanja vrste *T. dobrogicus* u odnosu na ostale vrste (Ivanović i sar., 2007; 2008). Postoje dva moguća objašnjenja za jasno izdvajanje podunavskog mrmoljaka od ostalih vrsta velikih mrmoljaka u pogledu osobina rane životne istorije i razvića. Jedno je da selekcija za morfološke odlike adulta utiče na razvojne mehanizme tokom embrionskog perioda, iako se za njih zna da mogu biti konzervativni (Richardson, 1999). Drugo objašnjenje je vezano za ekološke potrebe svake vrste, tj. evolutivne promene razvojnih mehanizama tokom embrionskog razvića su nastale zbog različitih zahteva prema ekološkim faktorima (Wray, 2000; Chipman i sar., 2000). Tokom evolucije velikih mrmoljaka, glavna promena u ekološkim zahtevima se desila kada je vrsta *T. dobrogicus* naselila plavne ravnice na prostorima današnjeg Dunava i njegovih pritoka. Tako nastale razvojne promene dovode do razlika u morfologiji i odlikama životne istorije u odnosu na ostale vrste iz grupe velikih mrmoljaka što je i verovatnije objašnjenje

za dobijene razlike između vrsta. Sličnost u razviću kod ostalih vrsta velikih mrmoljaka je verovatno u nasleđu tih karakteristika od zajedničkog pretka. Evolucija velikih mrmoljaka je još jedan primer gde su promene u ekologiji verovatno dovele do paralelnih promena fenotipa između vrsta (Sol i sar., 2005; Herrel i sar., 2008).

### 3.3. POGLAVLJE III: Stopa rasta larvi

#### Rezultati publikovani u:

Furtula M, Todorović B, Simić V, Ivanović A (2009) Interspecific differences in early life-history traits in crested newts (*Triturus cristatus* superspecies, Caudata, Salamandridae) from the Balkan Peninsula. **Journal of Natural History**, 43: 469-477.





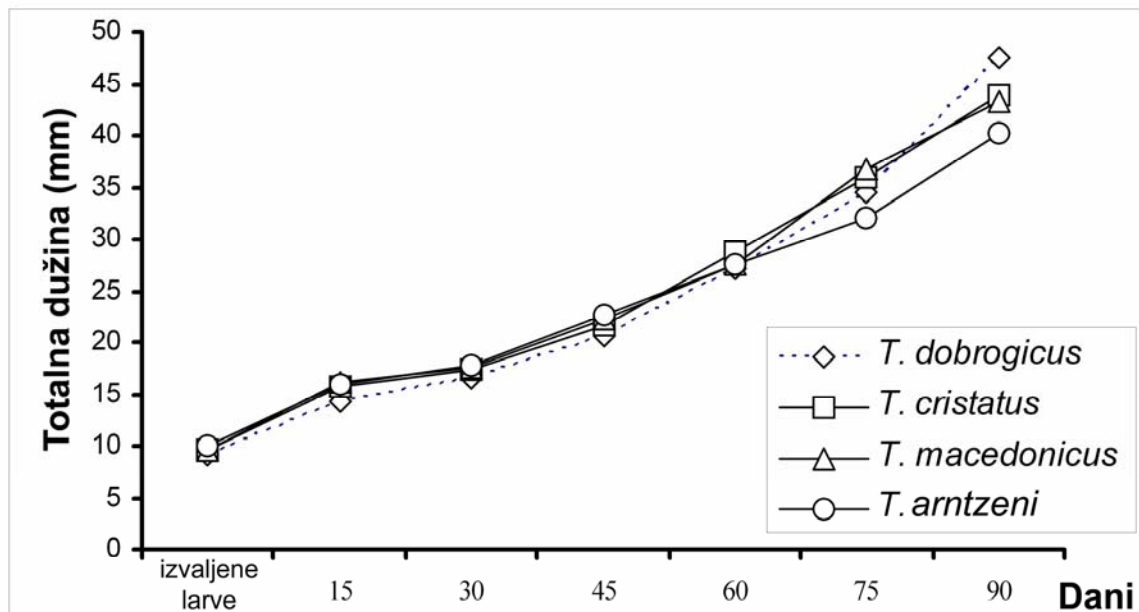
Stopa rasta larvi je odlika životne istorije koja direktno utiče na vreme metamorfoze i veličinu tek metamorfozirane jedinke. Stoga je ta odlika povezana sa preživljavanjem jedinki i samim tim utiče na adaptivnu vrednost jedinke (Rowe i Ludwig, 1991). Jedan od ciljeva ove teze je istraživanje razlika u stopama rasta larvi među vrstama velikih mrmoljaka. Veličina larvi (ukupna dužina, od vrha njuške do kraja repa) merena je na svakih petnaest dana od izvaljivanja larvi. Srednje vrednosti ukupne dužine larvi od izvaljivanja do devedesetog dana starosti za sve četiri analizirane vrste prikazane su u tabeli 3.3.1. Ukupna dužina tek izvaljenih larvi statistički se značajno razlikuje između vrsta ( $F = 27.22$ ,  $p < 0.0001$ ), kao i između kohorti (larvi izvaljenih iz jaja položenih od jedne ženke tokom jednog dana) unutar vrsta ( $F = 4.89$ ,  $p < 0.0001$ ). Tek izvaljene larve vrste *T. dobrogicus* su najmanje u poređenju sa preostale tri vrste, a najveće dimenzije tek izvaljenih larvi ima *T. arntzeni*. Larve vrsta *T. cristatus* i *T. macedonicus* su sličnih dimenzija (ANOVA, kontrast analiza,  $p = 0.748$ ). Kod larvi starih 15 dana pronađene su statistički značajne razlike i između vrsta ( $F = 63.46$ ,  $p < 0.0001$ ) i između kohorti unutar vrsta ( $F = 12.55$ ,  $p < 0.0001$ ). Larve *T. dobrogicus* su opet bile značajno manje u odnosu na ostale vrste (ANOVA, kontrast analiza,  $p < 0.0001$ ), *T. cristatus* i *T. macedonicus* su se međusobno malo razlikovale (ANOVA, kontrast analiza,  $p = 0.026$ ), dok su larve *T. arntzeni* bile značajno veće od *T. dobrogicus* larvi (ANOVA, kontrast analiza,  $p < 0.0001$ ), ali se pri tome nisu statistički značajno razlikovale u veličini od druge dve vrste. Na tridesetom danu starosti larvi, larve su se razlikovale između vrsta ( $F = 7.01$ ,  $p < 0.0001$ ) i između kohorti ( $F = 2.9$ ,  $p < 0.0001$ ). U ovom stadijumu, larve *T. dobrogicus* su bile manje u odnosu na sve ostale larve: *T. macedonicus* (ANOVA, kontrast analiza,  $p = 0.0002$ ), *T. cristatus* (ANOVA, kontrast analiza,  $p = 0.0041$ ) i *T. arntzeni* (ANOVA, kontrast analiza,  $p < 0.0001$ ). Kod larvi starosti 45 dana, dobijene su razlike između vrsta ( $F = 3.74$ ,  $p = 0.012$ ), ali nisu dobijene razlike između kohorti ( $F = 1.07$ ,  $p = 0.388$ ). U poređenju između vrsta, larve *T. dobrogicus* su bile manje u odnosu na *T. macedonicus* (ANOVA, kontrast analiza,  $p = 0.0309$ ) i u odnosu na *T. arntzeni* (ANOVA, kontrast analiza,  $p = 0.0013$ ). Kod larvi starosti 60 i 75 dana nisu dobijene razlike između vrsta. Međutim kod 90 dana starih

larvi, dobijena je razlika između vrsta ( $F = 3.33$ ,  $p = 0.0231$ ), pri čemu su larve *T. dobrogicus* bile veće u odnosu na *T. arntzeni* (ANOVA, kontrast analiza,  $p = 0.0034$ ).

**Tabela 3.3.1.** Srednje vrednosti (SV), standardne devijacije (SD) totalnih dužina larvi različitih starosti za 4 vrste velikih mrmoljaka.

	<i>T. macedonicus</i>			<i>T. cristatus</i>			<i>T. dobrogicus</i>			<i>T. arntzeni</i>		
	N	SV	SD	N	SV	SD	N	SV	SD	N	SV	SD
<b>Izvaljene larve</b>	244	9.52	0.74	103	9.55	0.84	162	9.16	1.07	146	10.03	0.63
<b>15 dana</b>	215	16.05	1.12	93	15.73	0.91	120	14.25	1.41	138	15.93	1.00
<b>30 dana</b>	94	17.58	1.70	63	17.39	1.94	92	16.44	2.22	113	17.66	2.16
<b>45 dana</b>	45	22.26	2.94	30	21.72	4.00	61	20.63	4.09	87	22.71	3.97
<b>60 dana</b>	29	27.52	3.65	17	28.72	7.17	39	27.13	6.09	71	27.49	4.23
<b>75 dana</b>	25	36.63	6.05	13	35.87	10.06	23	34.46	9.51	54	32.00	6.11
<b>90 dana</b>	19	43.22	6.11	9	43.93	6.09	13	47.60	10.99	51	40.29	7.69

Navedeni rezultati ukazuju da su razlike između vrsta mnogo veće nego između kohorti unutar vrsta. Takođe, razlike između kohorti se već gube kod larvi starosti 45 dana, dok razlike između vrsta ostaju. U prirodnim uslovima stopa rasta larvi zavisi od dostupnosti hrane, temperature, gustine populacije i drugih faktora (Berven i Chadra, 1988; Miaud i Merila, 2001; Orizaola i Brana, 2005). Eksperimentalni uslovi pod kojima su odgajane ove četiri vrste bili su istovetni za svaku vrstu, pa tako stopa rasta larvi je species-specifična odlika i svaka vrsta ima svoj obrazac rasta larvi (Slika 3.3.1.).



**Slika 3.3.1.** Stopa rasta larvi četiri analizirane vrste velikih mrmoljača.

Dobijeno je da se dužina trajanja larvenog perioda značajno razlikuje između vrsta ( $F = 10.49$ ,  $p < 0.0001$ ). *Triturus dobrogicus* je imao najduži larveni period u odnosu na ostale vrste. Ova vrsta se značajno razlikovala od drugih analiziranih vrsta i u veličini tek metamorfoziranih jedinki ( $F = 6.8$ ,  $p = 0.0012$ ). U međusobnom poređenju juvenilci ove vrste su bili veći od juvenilaca *T. cristatus* ( $p = 0.0276$ ), *T. macedonicus* ( $p = 0.0025$ ) i *T. arntzeni* ( $p = 0.0002$ ). Juvenilci vrste *T. arntzeni* su metamorfozirali sa najmanjom veličinom (Tabela 3.3.2.). U ovom eksperimentu čak 3 larve vrste *T. dobrogicus* nisu metamorfozirale pre perioda hibernacije.

**Tabela 3.3.2.** Standardna dužina metamorfoziranih juvenilnih jedinki i trajanje larvenog perioda sa standardnim devijacijama i opsegom za analizirane *Triturus* vrste.

Vrsta	N	SVL			Dužina trajanja larvenog perioda		
		SVL	SD	Opseg	SV	SD	Opseg
<i>T. macedonicus</i>	8	31.75	3.34	26.91-36.14	134.88	24.48	107-178
<i>T. cristatus</i>	4	34.00	3.87	29.88-37.63	141.75	15.17	119-150
<i>T. dobrogicus</i>	2	41.54	4.82	38.13-44.94	192.50	2.12	191-194
<i>T. arntzeni</i>	21	29.76	3.83	24.51-37.82	124.48	13.98	96-150

U prirodnim uslovima dobijene su slične vrednosti veličina juvenilnih jedinki za sve vrste: od 32.7 do 35.8 mm za *T. cristatus* metamorfozirane juvenilne jedinke (Arntzen, 2000), od 30 do 33 mm za juvenilne jedinke *T. macedonicus* (Gozzo i sar., 1999) i 33 mm prosečna veličina za metamorfozirane juvenilne jedinke *T. arntzeni* (Baker, 1988). Jedino se dobijena veličina juvenilnih jedinki *T. dobrogicus* razlikuje od prosečne veličine za tu vrstu od 35 mm (Cogalniceanu i Miaud, 2003).

### **Različite stope rasta larvi i dužine larvenog perioda kao adaptacije na tipove staništa**

Ovi dobijeni rezultati za veličine metamorfoziranih jedinki velikih mrmoljaka se ne slažu sa do sada objavljenim podacima. Dobijeni rezultati u ovoj tezi ukazuju na razlike u veličinama između larvi i tek metamorfoziranih juvenilnih jedinki između vrsta. Genetičke adaptacije na različite tipove staništa mogu da objasne razlike u odlikama životne istorije, uključujući vreme metamorfoze i veličinu jedinke po metamorfozi (Skelly i Freidenburg, 2000; Weitere i sar., 2004). Larve vrste *T. arntzeni* metamorfoziraju prve i sa manjom veličinom tela u odnosu na ostale vrste. Ova strategija im omogućava da brže napuste vodena staništa i pređu u terestričnu sredinu pre nego što se vodena sredina isuši ili

postane nepovoljna za razvoj larvi (usled povišene temperature ili nedostatka hrane). To je bitno u promenjivim uslovima gde ukoliko organizam ne stigne da metamorfozira na vreme, smanjuje mu se adaptivna vrednost (Rowe i Ludwig, 1991; Lytle, 2001). Međutim, kraće larveno vreme rezultira i u manjoj veličini jedinke pri metamorfozi, pa tako organizam mora da se opredeli između ove dve mogućnosti. Vrsta *T. arntzeni* naseljava efemerne bare na višim nadmorskim visinama. Međutim, vrsta *T. dobrogicus* naseljava otvorene vode i sporotekuće reke i vreme provedeno u vodi je znatno duže u odnosu na vrstu *T. arntzeni* (Arntzen, 2003). Larve vrsta *T. macedonicus* i *T. cristatus*, koje naseljavaju slična staništa, imaju sličnu veličinu sa larvama vrste *T. arntzen*. S druge strane, larveni period razvića je znatno duži kod vrste *T. dobrogicus*. Treba napomenuti da u eksperimentu tri jedinke ove vrste *T. dobrogicus* nisu ni metamorfozirale do perioda hibernacije, kao i da su samo dve jedinke imale poptunu metamorfozu. Stoga su larve ove vrste imale znatno veću veličinu u odnosu na druge vrste. Postojanje produženog larvenog perioda kod ove vrste su zabeležili i Litvinchuk i Borkin (2002).

### 3.4. POGLAVLJE IV: Ontogenija oblika tela larvi

#### **Rezultati publikovani u:**

Ivanović A., Cvijanović M., Kalezić M. L. 2010. Ontogeny of body form and metamorphosis: insights from the crested newts. **Journal of Zoology**, accepted for publication

Istraživanje promena oblika i veličine tokom ontogenije je od posebnog značaja za shvatanje procesa evolucione raznolikosti, tj. stope promena i opseg variranja pomažu boljem shvatanju adaptacija i raznih razvojnih ograničenja (Maier, 1999).

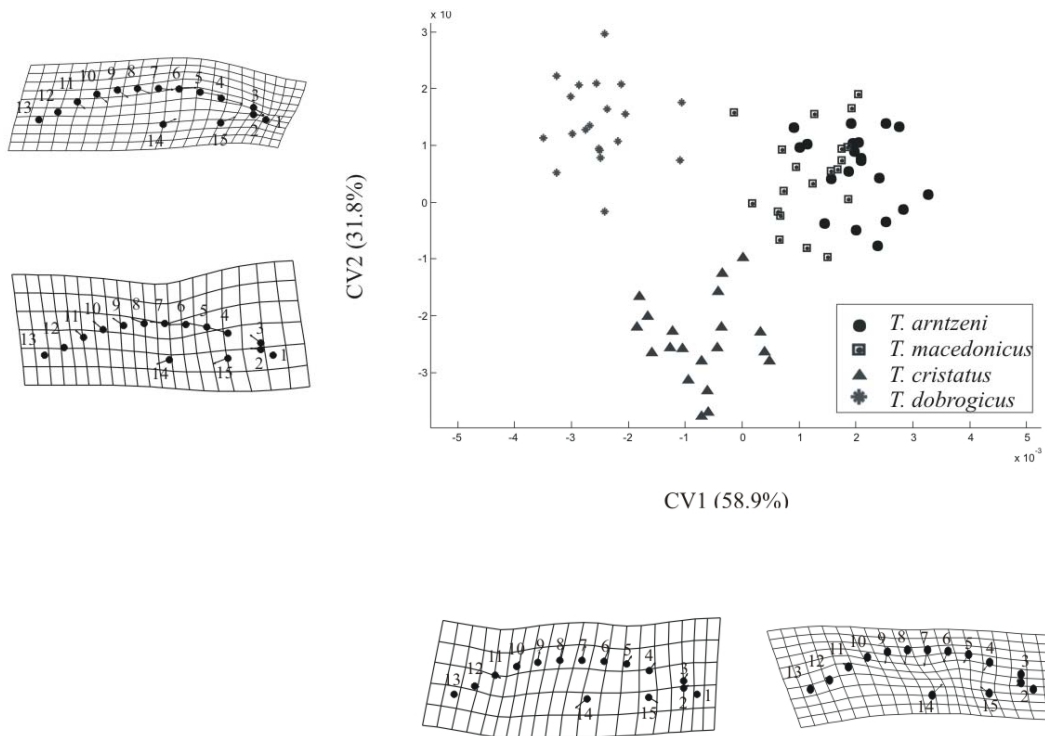
Da bi se poredile razlike u veličini tela između vrsta velikih mrmoljaka tokom ontogenije, urađena je analiza varijanse za CS (meru veličine) i dobijeno je da se analizirane vrste statistički značajno razlikuju u veličini larvi na starosti 75, 90 i 105 dana (Tabela 3.4.1.). Na svim uzrastima larvi, vrste *T. macedonicus* i *T. arntzeni* su značajno veće od *T. cristatus* i *T. dobrogicus* (ANOVA, kontrast analiza,  $p < 0.05$ ). Međutim, ovakve razlike nisu dobijene kod larvi koje su započele metamorfozu. Na ovom stupnju, samo su larve *T. macedonicus* bile značajno drugačije od larvi vrste *T. dobrogicus*. Kod juvenilnih jedinki nisu nađene razlike između vrsta u njihovom međusobnom poređenju veličina ( $p > 0.05$ ).

**Tabela 3.4.1.** Srednje vrednosti (SV) i standardne devijacije (SD) za meru veličine (CS) za četiri vrste velikih mrmoljaka tokom njihove ontogenije. Razlike u veličinama između vrsta su testirane analizom varijanse (ANOVA).

	<i>T. arntzeni</i>			<i>T. macedonicus</i>			<i>T. cristatus</i>			<i>T. dobrogicus</i>			ANOVA		
	N	SV	SD	N	SV	SD	N	SV	SD	N	SV	SD	F	df	p
75 dana stare larve	20	50.8±4.7		20	43.9±6.4		20	32.98±4.2		20	35.7 ±4.4		52.36	3	<.0001
90 dana stare larve	20	55.1±5.0		20	53.0±4.1		20	55.1±5.6		20	41.7±5.8		43.69	3	<.0001
105 dana stare larve	20	55.9±4.2		20	57.1±5.5		20	55.9±7.5		20	48.4±3.2		20.64	3	<.0001
metamorf. larve	19	59.7±4.8		20	63.6±4.9		10	58.4±7.7		20	56.9±6.8		4.64	3	0.0053
juvenilne jedinke	15	59.9±5.1		15	64.3±4.3		9	59.3±4.7		16	63.6±6.9		2.82	3	0.0478

Pomenute vrste se statistički značajno razlikuju i u obliku larvi. Razlike su dobijene i kod larvi starih 75, 90 i 105 dana (Tabela 3.4.2.). Kanonijska diskriminantna analiza je pokazala jasno razdvajanje vrsta kod larvi starih 75

dana. Prve dve ose opisuju 90.7% ukupnih razlika. U morfološkom prostoru opisanom prvom i drugom kanonijskom osom, *T. arntzeni* i *T. macedonicus* su grupisani zajedno dok se *T. cristatus* i *T. dobrogicus* jasno izdvajaju. Prva kanonijska osa opisuje skoro 59% ukupnih razlika u obliku larvi između vrsta. Razlike u obliku koje izdvajaju *T. dobrogicus* u odnosu na *T. arntzeni* i *T. macedonicus* leže u obliku tela i visini repnog nabora. Larve *T. dobrogicus* imaju relativno kraće telo i viši repni nabor u poređenju sa *T. arntzeni* i *T. macedonicus*; odnosno, *T. arntzeni* i *T. macedonicus* imaju dužu njušku i izduženije telo. *Triturus cristatus* se po obliku nalazi između ovih vrsta. Druga osa opisuje 31.8% razlika u obliku tela. Po ovoj osi se izdvajaju larve *T. cristatus* koje imaju duže njuške (rastojanje između vrha njuške i oka) (Slika 3.4.1.).

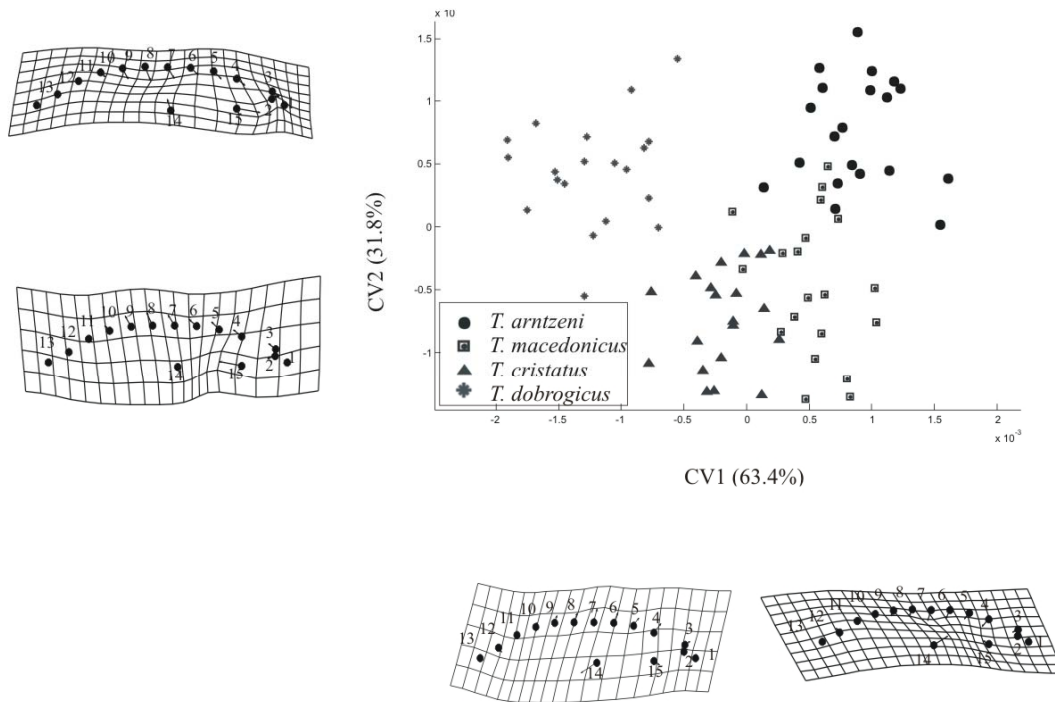


**Slika 3.4.1.** Položaj larvi starih 75 dana za četiri vrste velikih mrmoljaka u prostoru opisanom prve dve kanonijske ose. Promene oblika larvi opisane kanonijskim osama prikazane su deformacijama mreže.



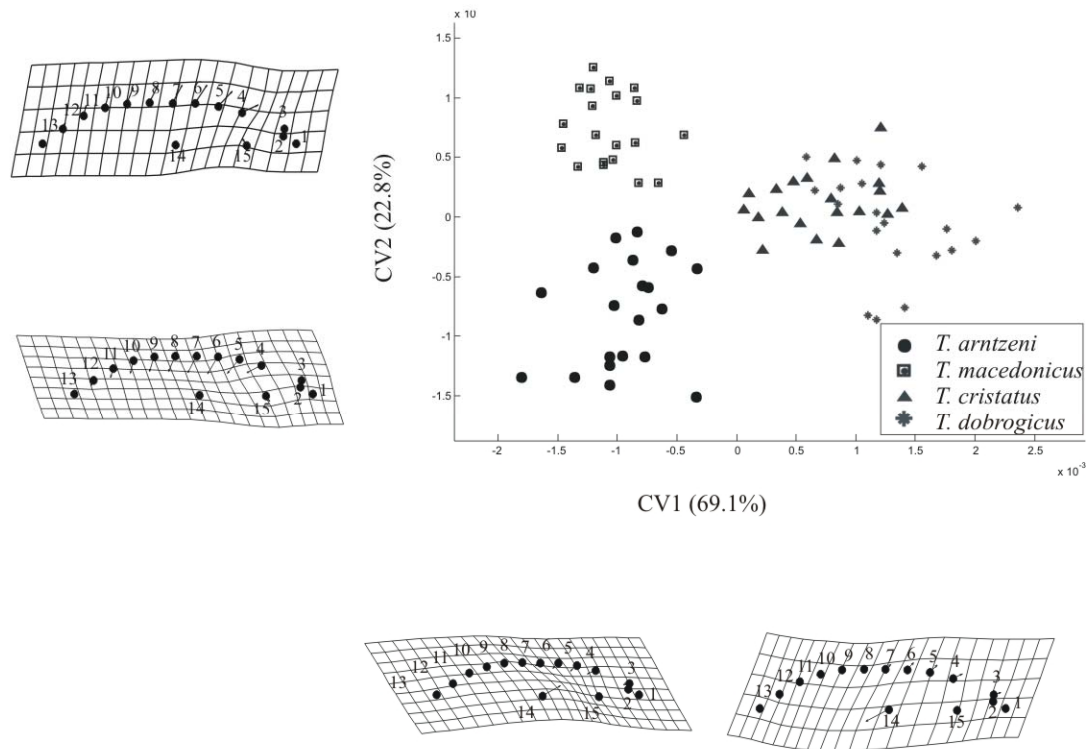
Koristeći rezultate iz kanonijske diskriminantne analize, izračunati su procenti korektno identifikacije. Na osnovu ovih rezultata, 96.3% larvi starih 75 dana može se prema obliku tačno klasifikovati u *a priori* određene grupe (vrste).

Kod larvi starih 90 dana, kanonijska diskriminantna analiza izdvaja prve dve ose koje opisuju 95.2% ukupnih razlika u obliku larvi između analiziranih vrsta. Položaj jedinki u prostoru definisanom sa prve dve ose dat je na Slici 3.4.2. Po prvoj osi se jasno izdvaja *T. dobrogicus* u odnosu na ostale vrste po dužem i širem dorzalnem repnom naboru. Po drugoj osi se odvajaju *T. cristatus*, *T. arntzeni* i *T. dobrogicus*. U odnosu na *T. cristatus*, *T. arntzeni* i *T. dobrogicus* su sličniji po obliku repa (Slika 3.4.2.). Rezultati kanonijske analize opisuju 96.3% tačne identifikacije larvi po vrstama.



**Slika 3.4.2.** Položaj larvi starih 90 dana za četiri vrste velikih mrmoljaka u prostoru opisanom sa prve dve kanonijske ose. Promene oblika larvi opisane kanonijskim osama prikazane su deformacijama mreže.

Kod larvi starih 105 dana prve dve ose dobijene diskriminativnom kanonijskom analizom opisuju 91.9% ukupnih razlika obliku kod analiziranih vrsta. U prostoru definisanom sa prve dve kanonijske ose, *T. arntzeni* i *T. macedonicus* jasno se odvajaju od ostalih vrsta, dok su *T. dobrogicus* i *T. cristatus* grupisani zajedno. Na osnovu promena oblika opisanih prvom osom, *T. dobrogicus* i *T. cristatus* imaju širi i viši repni nabor. Druga osa razdvaja *T. macedonicus* i *T. arntzeni* po obliku repa (Slika 3.4.3.). Čak 97.5% larvi starih 105 dana je tačno svrstano po vrstama u odnosu na njihov oblik tela.



**Slika 3.4.3.** Položaj larvi starih 105 dana za četiri vrste velikih mrmoljača u prostoru opisanom prve dve kanonijske ose. Promene oblika larvi opisane kanonijskim osama prikazane su deformacijama mreže.

**Tabela 3.4.2.** Rezultati multivarijantne analize kovarijanse varijabli oblika sa vrstom i varijablom veličine (CS) kao kovarijabloma.

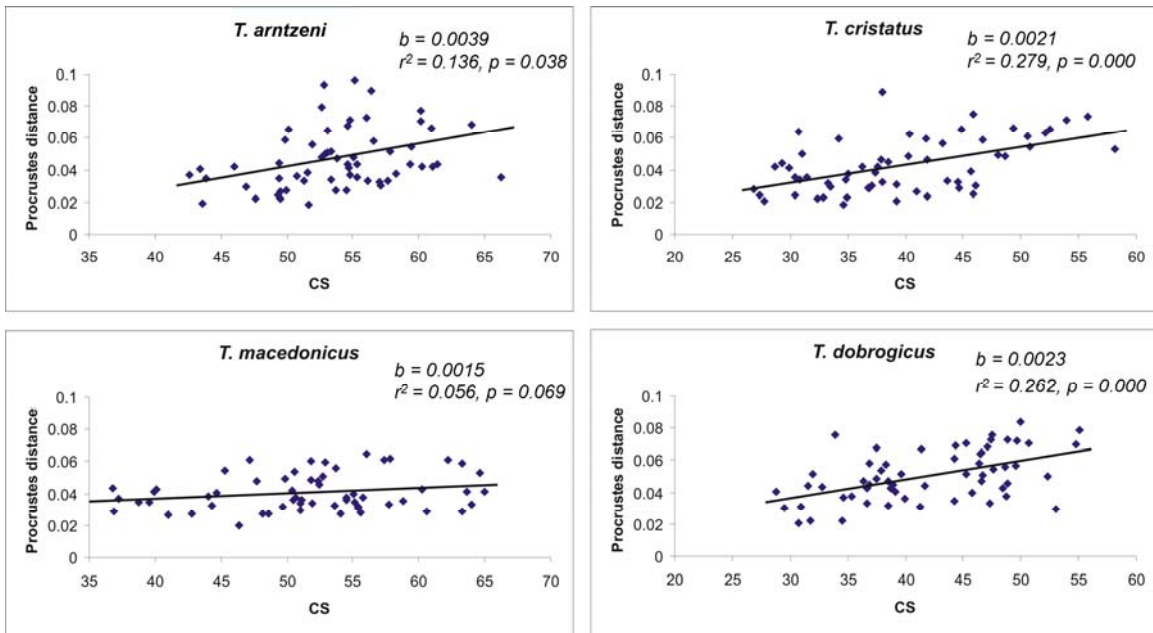
<b>Starost</b>	<b>Wilks' Lambda</b>	<b>F</b>	<b>df1</b>	<b>df2</b>	<b>p</b>
<b>75 dana stare larve</b>					
CS	0.325974	3.74	26	47	<b>&lt;.0001</b>
Vrsta	0.107035	2.01	78	141.41	<b>0.0002</b>
CS × Vrsta	0.126449	1.81	78	141.41	<b>0.0012</b>
<b>90 dana stare larve</b>					
CS	0.408648	2.62	26	47	<b>0.0020</b>
Vrsta	0.176132	1.43	78	141.41	<b>0.0339</b>
CS × Vrsta	0.180747	1.40	78	141.41	<b>0.0423</b>
<b>105 dana stare larve</b>					
CS	0.423792	2.46	26	47	<b>0.0036</b>
Vrsta	0.160662	1.53	78	141.41	<b>0.0147</b>
CS × Vrsta	0.168850	1.47	78	141.41	<b>0.0233</b>
<b>metamorfozirane larve</b>					
CS	0.224283	4.79	26	36	<b>&lt;.0001</b>
Vrsta	0.148694	1.24	78	108.52	0.1492
CS × Vrsta	0.165757	1.15	78	108.52	0.2537
<b>juvenilci</b>					
CS	0.306014	1.92	26	22	0.0623
Vrsta	0.087304	1.08	78	66.656	0.3796
CS × Vrste	0.079368	1.14	78	66.656	0.2931

Za razliku od istraživanih stupnjeva tokom larvenog perioda gde su dobijene jasne razlike između vrsta u obliku larvi, kod jedinki koje metamorfoziraju i kod juvenilnih jedinki nisu dobijene razlike između vrsta (Tabela 3.4.2.).

Za određivanje ontogenetskih putanja u promenama oblika tela podaci za sva tri larvena stupnja su grupisani. Analizama specifičnih alometrijskih nagiba za svaku vrstu dobijena je statistiki značajna interakcija između vrste i mere veličine (Wilks'Lambda = 0.325,  $F = 3.625$ ,  $p < 0.0001$ ). Tako dobijena statistički

značajna interakcija ukazuje na postojanje razlika između vrsta u specifičnim ontogenetskim putanjama oblika larvi.

Za procenu stope promena oblika za svaku vrstu ponaosob, izračunata je količina promena oblika (Prokrustova distanca) između svake jedinice na svakom od analiziranih stupnjeva u odnosu na tri najmlađe, odnosno najmanje larve u ukupnom uzorku. Zatim je istražen odnos količine promena oblika (Prokrustovih distanci) i povećanja ukupne veličine larvi (parametar CS). Ova analiza pokazuje opšti trend povećanja stope promena oblika sa povećanjem veličine larvi tokom larvenog perioda ( $r^2 = 0.075$ ,  $p < 0.0001$ ). Specifične regresione prave za svaku vrstu se razlikuju, kao i procenjene stope promena oblika u svim međusobnim poređenjima, osim između *T. cristatus* i *T. dobrogicus*. Interesantno je, da kod vrste *T. macedonicus* nije pronađen statistički značajna povezanost između veličine tela (CS) i stope promena oblika (Slika 3.4.4.).



**Slika 3.4.4.** Odnos između stope ukupnih promena (Prokrustove distance) i veličine tela (CS) dobijen modelom II tipa regresije (SMA). **b** – regresioni nagib,  $r^2$  - koeficijent određivanja, i **p** – statistička značajnost su dati za sve analizirane vrste.

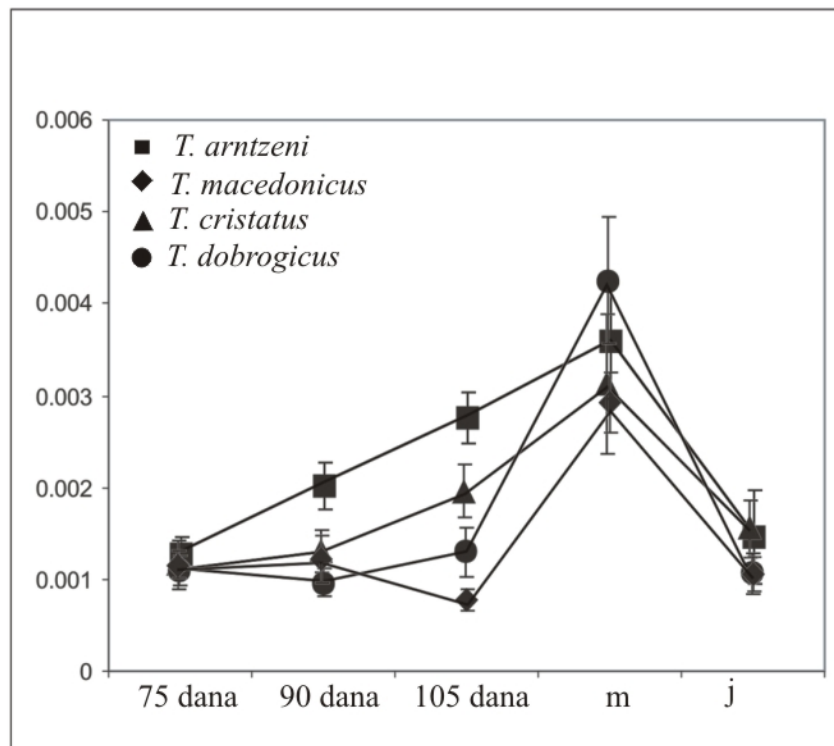
Kada je u pitanju varijansa oblika, sličan obrazac variranja je dobijen kod svih analiziranih vrsta. Najmanja varijansa utvrđena je kod larvi starosti 75 dana, dok je najveća varijansa dobijena kod larvi u toku metamorfoze (Slika 3.4.5.). Poređenjem uzrasno specifičnih kovarijacionih matrica dobijeno je da način variranja oblika tela ostaje stabilan tokom larvenog perioda (Tabela 3.4.3.). Za sva poređenja matrica između svih ontogenetskih perioda, kao i između istih ontogenetskih perioda različitih vrsta (Tabela 3.4.4.) dobijene su značajne zavisnosti ( $p < 0.001$  u svim poređenjima). Jedino se način kovariranja menja tokom metamorfoze.

**Tabela 3.4.3.** Rezultati poređenja uzrasno specifičnih kovarijacionih matrica između ontogenetskih perioda. Sličnost matrica je testirana na osnovu 10000 ponavljanja.

<b>Vrsta</b>	<b>75/90</b>	<b>90/105</b>	<b>105/m</b>
<i>T. arntzeni</i>	0.85	0.68	0.75
<i>T. macedonicus</i>	0.85	0.64	0.47
<i>T. cristatus</i>	0.85	0.86	0.55
<i>T. dobrogicus</i>	0.81	0.86	0.46

**Tabela 3.4.4.** Rezultati poređenja uzrasno specifičnih kovarijacionih matrica između vrsta. Sličnost matrica je testirana na osnovu 10000 ponavljanja. **75** – 75 dana stare larve; **90** – 90 dana stare larve; **105** – 105 dana stare larve; **m** – larve tokom metamorfoze; **j** – juvenilne jединke.

<b>Poređene vrste</b>	<b>75</b>	<b>90</b>	<b>105</b>	<b>m</b>	<b>j</b>
<i>T. arntzeni</i> / <i>T. macedonicus</i>	0.85	0.85	0.58	0.66	0.56
<i>T. arntzeni</i> / <i>T. cristatus</i>	0.89	0.91	0.67	0.73	0.80
<i>T. arntzeni</i> / <i>T. dobrogicus</i>	0.72	0.81	0.69	0.66	0.89
<i>T. macedonicus</i> / <i>T. cristatus</i>	0.83	0.87	0.80	0.78	0.47
<i>T. macedonicus</i> / <i>T. dobrogicus</i>	0.80	0.81	0.74	0.92	0.56
<i>T. cristatus</i> / <i>T. dobrogicus</i>	0.74	0.83	0.80	0.89	0.90



**Slika 3.4.5.** Totalna varijansa oblika tela na različitim periodima tokom ontogenije velikih mrmoljaka. *m* – larve tokom metamorfoze; *j* – juvenilne jedinke.

### ***Species-specifičan oblik larvi i „juvenilni filotipski period“***

Kod organizama sa složenim životnim ciklusom glavne evolutivne promene u obliku tela javljaju se tokom metamorfoze (Strauss i Altig, 1992). Takođe, glavne modifikacije tela nastaju na kraju larvenog razvića zbog povećanja verovatnoće preživljavanja u novoj sredini (Alberch i sar., 1979). Kada su u pitanju veliki mrmoljci, pokazano je da u slučaju glavenog skeleta, do najvećih promena u obliku dolazi posle metamorfoze (Ivanović i sar., 2007). Rezultati ove teze ukazuju da se veliki mrmoljci razlikuju po obliku još tokom larvenog razvića, tj. barem od trenutka kada su larve potpuno formirane (starosti 75 dana kada je započela diferencijacija ekstremiteta). Ove vrste se razlikuju i u

stopi promena oblika, a sličnosti između vrsta se javljaju u toku metamorfoze kao i kod juvenilnih jedinki.

Na osnovu razlika u morfologiji između vrsta, *T. dobrogicus* i *T. cristatus* su sličniji jedan drugom, naročito u obliku larvi kao i u stopi ontogenetskih promena. Ove vrste se razlikuju od vrsta *T. arntzeni* i *T. macedonicus* i po obliku repnog nabora. Pošto su rep i repni nabor bitni za larve i njihovo kretanje, razlike u obliku larvi se mogu objasniti kao adaptacija na različite vodene ekosisteme (Van Buskirk, 2009) koje ove vrste nastanjuju (Slika 3.4.6.). Promene oblika tela larvi velikih mrmoljaka tokom ontogenije je od posebnog značaja jer „variranje stvara i menja razviće i tako obezbeđuje osnovu za evolutivnu raznolikost adultnih oblika“ (Hendrikse i sar., 2007).

Dinamika varijansi u obliku tela velikih mrmoljaka tokom ontogenija odvaja dva perioda sa kanalisanim razvićem, tj. manjom varijansom promene oblika. Prvi period je kada su larve stare 75 dana i kada su potpuno formirane i drugi period kada je metamorfoza završena i kada juvenilne jedinke nastanjuju novu sredinu. Kod svih vrsta je najveća varijansa promene oblika dobijena u toku same metamorfoze. Uzrok tome mogu biti individualne razlike u vremenu početka metamorfoze, odnosno hormonski zavisnim promenama koje se dešavaju kod svake jedinke tokom tog procesa metamorfoze (Rose, 1999; Heyland i sar., 2004). Takođe, brža stopa razvića može biti uzrok visoke varijanse u obliku tokom ranijeg razvića (Hallgrimson, 1999; Fisher – Rousseau i sar., 2009). Ubrzano razviće i promene oblika, kao i variranje stope i vremena promena tokom metamorfoze, mogu da povećaju varijansu u periodu metamorfoze. Zanimljivo je da sličan obrazac varijanse tokom ontogenije postoji kod sve četiri analizirane vrste iako se one međusobno razlikuju po pravcu i stopi promene oblika tela.

Sličnosti u obliku juvenilnih jedinki između vrsta i niska varijansa njihovog oblika tela ukazuju na postojanje „juvenilnog filotipskog perioda“ u ontogeniji velikih mrmoljaka. U tom periodu, kanalisanaost uspešno smanjuje variranje oblika tela koji može da se dogodi usled genetičkih ili sredinskih variranja tokom razvića velikih mrmoljaka.

Rezultati dobijeni ovim istraživanjima ukazuju na metamorfozu kao ključni događaj u tranziciji oblika tela prelaskom iz vodene u terestričnu sredinu koja „resetuje“ različite ontogenetske putanje vrsta velikih mroljaka larvi. Odnosno, i pored toga što ontogenetske putanje larvi međusobno divergiraju, juvenilne jedinice različitih vrsta mrmoljaka karakteriše odsustvo statistički značajnih razlika u veličini i obliku, postojanje podudarnih alometrijskih odnosa, kao i znatno niži nivo varijabilnosti u obliku u poređenju sa prethodnim stupnjem.



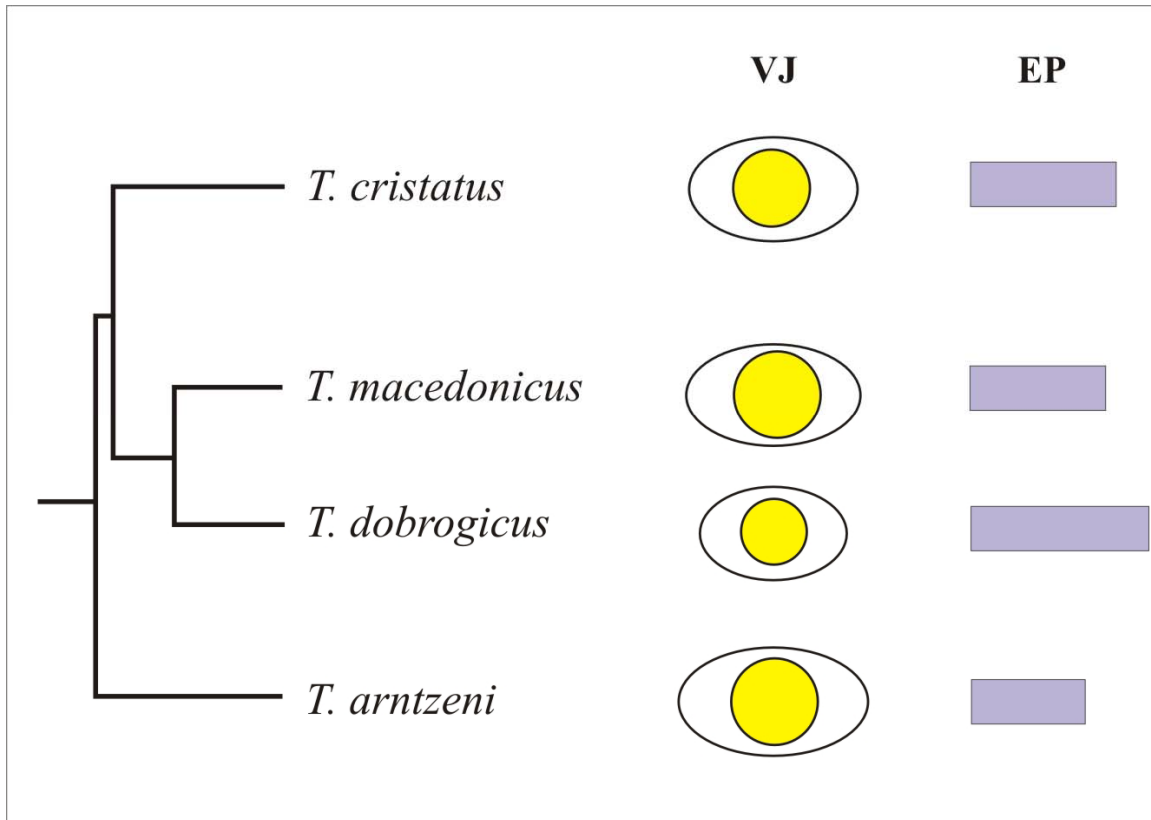
**3.5. POGLAVLJE V: Filogenija osobina životne istorije**



Kao što je već pomenuto, veliki mrmoljci imaju monofiletsko poreklo (Steinfartz i sar., 2007; Arntzen i sar., 2007), a centar njihovog postanka i diverziteta je Balkansko poluostrvo (Crnobrnja-Isailović i sar., 1997, Arntzen i sar. 2007). Njihovi filogenetski odnosi, iako detaljno istraživani, i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni. Jedan od velikih problema je nepodudarnost između filogenetskih stabala dobijenih na osnovu mitohondrijalnih i nuklearnih gena i morfoloških podataka.

Mapiranjem osobina životne istorije na filogenetska stabla može se pretpostaviti evolucija date fenotipske karakteristike i utvrditi koje vrste imaju predačke osobine (pleziomorfne), a koje imaju izvedene (apomorfne) osobine. Na slici 3.5.1. su predstavljene karakteristike jaja kao osobine životne istorije za svaku analiziranu vrstu u ovoj tezi. Njihove veličine su prikazane u pravoj proporciji. Kako je to već istaknuto (poglavlje 3.1.), vrsta *T. dobrogicus* ima najmanja jaja i najveći odnos između zapremina vitelusa i galerte, dok vrsta *T. arntzeni* ima najveća jaja i najmanji odnos zapremina vitelusa i galerte. Kako se vrsta *T. arntzeni* nalazi u osnovi stabla, može se pretpostaviti da su veća jaja i manji odnos analiziranih karakteristika predačke osobine. Vrsta *T. macedonicus* prati po veličini jaja predačka stanja karaktera. Vrsta *T. cristatus* ima manju zapreminu vitelusa i veći odnos analiziranih zapremina pa se može smatrati da zajedno sa vrstom *T. dobrogicus* ima izvedena stanja tih karaktera. S obzirom na topologiju filogenetskog stabla istraživanih vrsta velikih mrmoljaka, jasno je da stepen filogenetske srodnosti ne «prati» sličnost ovih fenotipskih odlika (npr. srodne vrste *T. macedonicus* i *T. dobrogicus* imaju bitno različite fenotipove jaja, dok isti fenotipovi odlikuju manje srodne vrste *T. cristatus* i *T. dobrogicus*). Teorijski gledano, do ovakve evolucije odlika jaja moglo je da dođe na različite načine. Tako je moguće da je na čvorištu 2 došlo do promene fenotipa jaja (nastanak apomorfnih fenotipova), s tim da je kod vrste *T. macedonicus* došlo do reverzije predačkog fenotipa. Reverzije morfoloških odlika se retko događaju (Galis i sar. 2010). Stoga je verovatniji drugi «scenario» po kome su jedinke vrste *T. macedonicus* zadržale poredački fenotip, a da su slični apomorfni fenotipovi vrsta *T. dobrogicus* i *T. cristatus* rezultat nezavisnih evolucionih događaja

homoplazija i to paralelizama. Do ovakvih evolucionih promena je najverovatnije došlo delovanjem sličnih selektivnih pritisaka usled sličnih ekoloških niša koje zauzimaju ove dve vrste.

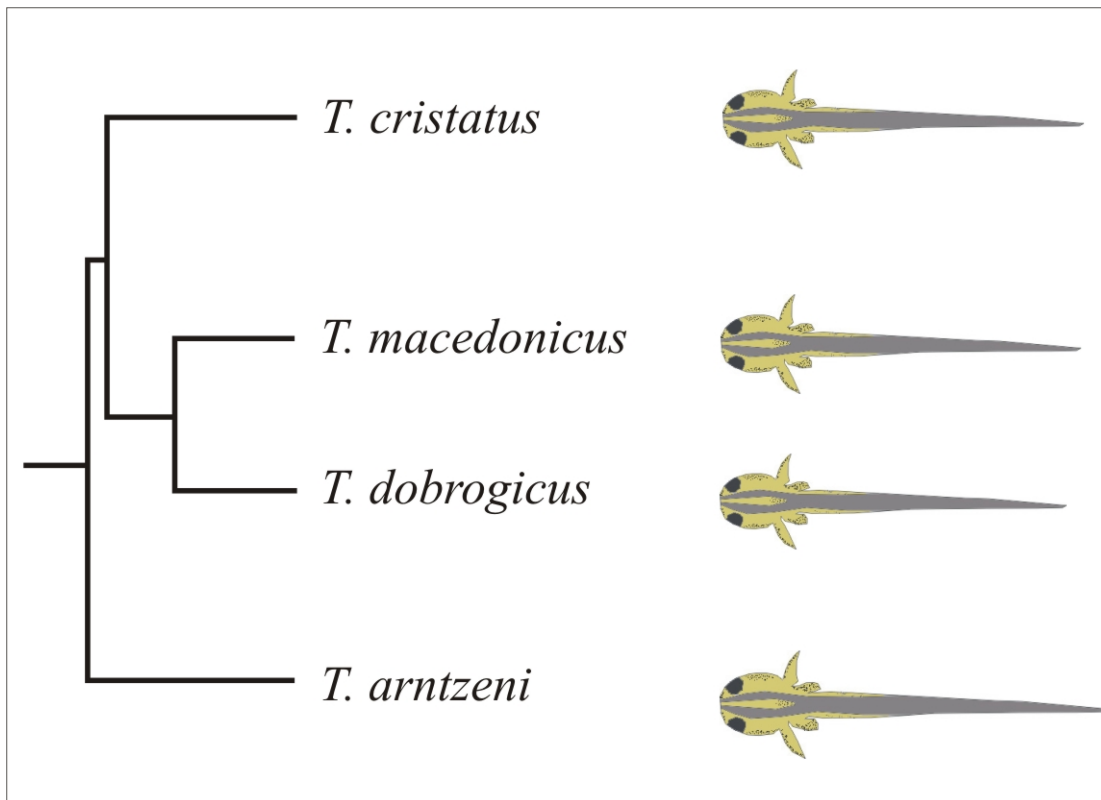


**Slika 3.5.1.** Filogenetski odnosi analiziranih vrsta velikih mrmoljaka na osnovu filogenetskog stabla za rod *Triturus* dobijenog analizama DNK sekvenci iz dva mitohondrijska i pet nuklearnih gena (iz Espregueira Themudo i sar., 2009, modifikovano) sa pregledom dve odlike životne istorije. VJ – veličina jaja (zapremina vitelusa i galerte kao i njihov odnos); EP – dužina trajanja embrionalnog perioda.

Takođe, i dužina trajanja embrionskog perioda se razlikuje između analiziranih vrsta i minimalne i maksimalne vrednosti su kod vrsta koje se najviše odvajaju. *Triturus arntzeni* ima najkraći embrionalni period dok vreme od polaganja jaja do izvaljivanja larve je najduže kod vrste *T. dobrogicus*. Kako

dužina trajanja embrionskog perioda zavisi od temperature na kojoj se razviće odvija, ova osobina nije dalje razmatrana.

Isti obrazac razlika između analiziranih vrsta se može uočiti i u pregledu veličina tek izvaljenih larvi (Slika 3.5.2.). Veće larve ima vrsta *T. arntzeni*, dok najmanje larve po veličini ima vrsta *T. dobrogicus*. Dakle, veće larve se mogu smatrati pleziomorfnom stanjem te osobine, dok su manje larve izvedeno stanje te osobine.



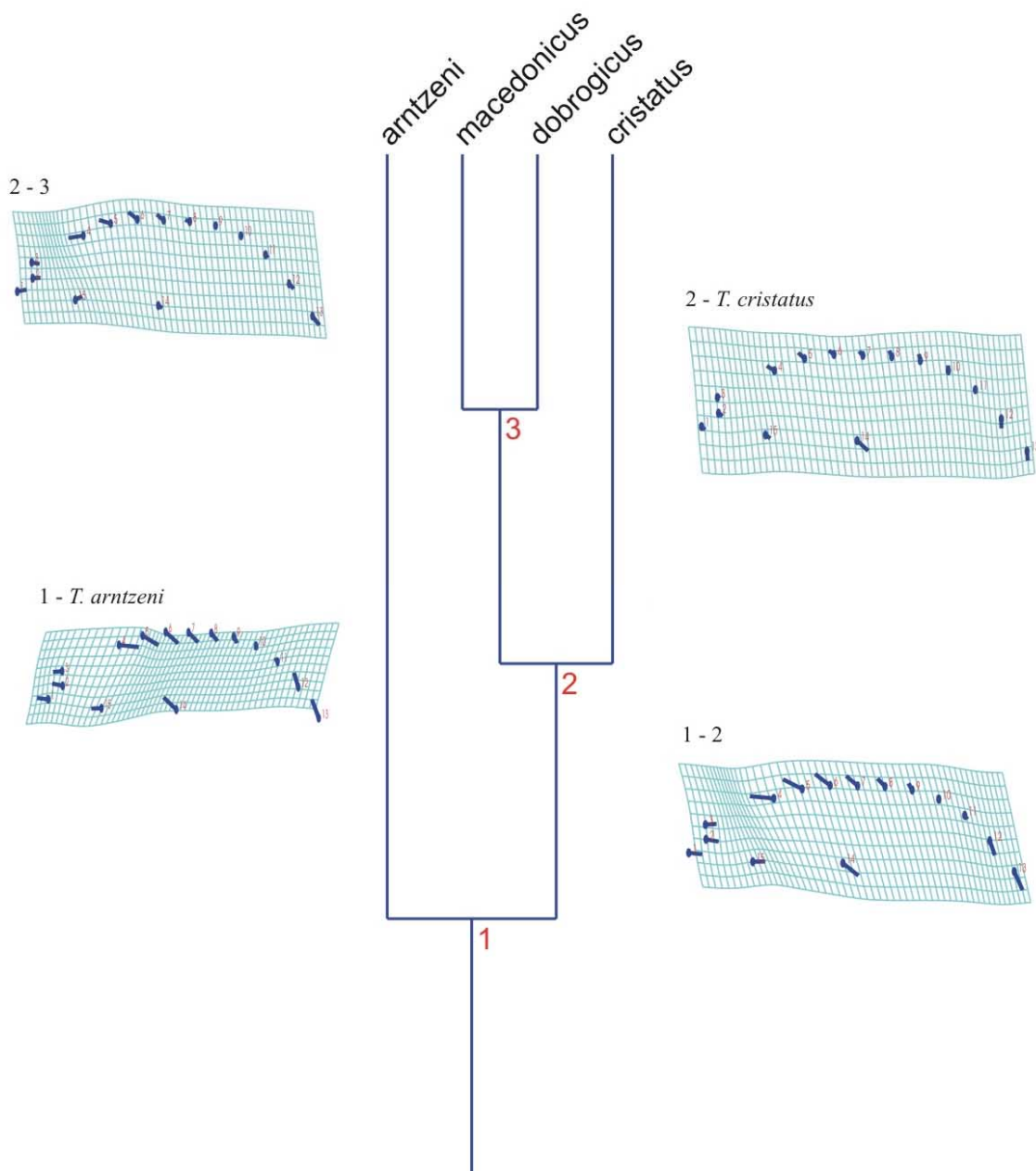
**Slika 3.5.2.** Filogenetski odnosi analiziranih vrsta velikih mrmoljaka na osnovu filogenetskog stabla za rod *Triturus* dobijenog analizama DNK sekvenci iz dva mitohondrijska i pet nuklearnih gena (iz Espregueira Themudo i sar., 2009, modifikovano) sa pregledom veličina njihovih tek izvaljenih larvi.

Mapiranjem promena oblika larvi starosti 105 dana na filogenetsko stablo može se pretpostaviti slika evolucije promena u obliku larvi kod vrsta velikih

mrmoljaka. Kako je vrsta *T. arntzeni* u osnovi filogenetskog stabla njegov izgled je najbliži predačkom tj. ima pleziomorfni oblik tela larvi. Dalja evolucija je dovela do izduživanja glavenog regiona, skraćivanja rastojanja između ekstremiteta i sužavanja tela i repnog nabora (slika 3.5.3.). Generalne promene oblika larvi preostalih analiziranih vrsta u odnosu na oblik larve pretka ide u suprotnom pravcu. Tako se kod njih skraćuje glaveni region, povećava rastojanje između ekstremiteta i povećava telo i repni nabor (Slika 3.5.3.). Promene kod vrste *T. cristatus* u odnosu na generalni obrazac promena je povećanje tela, a smanjenje repnog nabora. Promene kod vrsta *T. macedonicus* i *T. dobrogicus* u odnosu na generalni obrazac izgleda larvi za tri analizirane vrste je takođe skraćivanje glavenog regiona i blago izduživanje tela.

Iz svih navedenih osobina se može zaključiti da vrsta *T. dobrogicus* ima najviše apomorfni osobinama životne istorije, uključujući i u obliku tela larvi i adultnih jedinki (promene veličine i oblika tela adultnih jedinki nisu bile predmet istraživanja u ovoj disertaciji). Step en izraženosti tih apomorfni odlika je takav da se može govoriti i o postojanju autopomorfizama kod podunavskog velikog mrmoljaka. Ovakve evolucione promene su mogle nastati kao rezultat brze evolucije u razviću, morfologiji, kao i u odlikama životne istorije. Razlike u osobinama životne istorije prate i razlike u ekološkim karakteristikama, kao što su npr. veličina areala, tip staništa, kao i dužina trajanja akvatičnog i terestričnog perioda tokom godine. Areal ove vrste je daleko manji u odnosu na areale ostalih vrsta (slika 1.2.1.), po tipu staništa su u većim vodama pa čak i sporotekućim vodama (Arntzen, 2003) i čak su do 6 meseci u vodama tokom godine (Arntzen, 2003). Sve razlike dobijene kod ove vrste u osobinama životne istorije se tako mogu objasniti uticajem sredine tj. drugačijim sredinskim uslovima. Razlike su mogle nastati kao posledica prilagođavanja na različite mikroklimatske uslove, ishranu, tip staništa itd. Sa druge strane, vrsta *T. arntzeni* koja se nalazi u osnovi stabla se takođe razlikuje u odnosu na ostale vrste zadržavajući pleziomorfna stanja odlika životne istorije. Tako su veća jaja, manji odnos zapremina galerte i vitelusa, veće dužine izvaljene larve, kao i kraće trajanje embrionskog perioda predačke osobine životne istorije velikih mrmoljaka. Kako je to već istaknuto,

vrsta *T. macedonicus* uglavnom zadržava takva stanja odlika, dok vrsta *T. cristatus* ima izvedena stanja tih odlika.



**Slika 3.5.3.** Filogenetski odnosi analiziranih vrsta velikih mrmoljaka sa promenama oblika tela larvi kod larvi starosti 105 dana. Promene oblika larvi su prikazane deformacionim mrežama.

Kada je u pitanju promena oblika tela larvi, dobijeni rezultati ukazuju na postojanje filogenetskog signala kod larvi starosti 105 dana. Međutim, treba uzeti u obzir da su larve vrste *T. arntzeni* imale kraće larveno razviće u odnosu na ostale analizirane vrste i da su promene koje se dobijaju u obliku tela larvi u stvari promene koje nastaju tokom procesa metamorfoze.

Ovi rezultati ukazuju da je evolucija velikih mrmoljaka još jedan primer gde su promene u ekologiji verovatno dovele do paralelnih promena fenotipa i odlika životne istorije između vrsta (Sol i sar., 2005; Herrel i sar., 2008).

## 4. ZAKLJUČCI

- Iz dobijenih rezultata u ovoj tezi proizilazi da je veličina jaja kod velikih mrmoljaka odlika životne istorije koja je specifična za svaku vrstu. Vrsta *T. dobrogicus* ima najmanji vitelus, a najveći odnos zapremine galertnog omotača i vitelusa, vrste *T. arntzeni* i *T. macedonicus* imaju najveći vitelus, a odnos galerta/vitelus najmanji. Po veličini vitelusa i odnosu galerta/vitelus, vrsta *T. cristatus* se nalazi između *T. dobrogicus*, sa jedne strane i *T. arntzeni* i *T. macedonicus* sa druge strane.
- Embrionsko razviće velikih mrmoljaka je slično u pogledu razvojnih stadijuma i stope preživljavanja, dok se vrste međusobno razlikuju u brzini razvića i korelacijama odlika životne istorije i razvića. Vrsta koja se dužim embrionskim periodom i različitim vremenima pojavljivanja određenih morfoloških odlika jasno odvaja od ostalih je *T. dobrogicus*, posebno u poređenju sa vrstama *T. macedonicus* i *T. arntzeni*.
- Dobijeni rezultati u ovoj tezi ukazuju na razlike u veličinama između larvi i tek metamorfoziranih juvenilnih jedinki između analiziranih vrsta velikih mrmoljaka. Larve vrste *T. arntzeni* metamorfoziraju prve i manje su veličine u odnosu na ostale vrste. Larve vrste *T. dobrogicus* su imale znatno veću veličinu tela, kao i produžen larveni period u odnosu na druge vrste. Larve vrsta *T. macedonicus* i *T. cristatus* imaju sličnu veličinu tela sa larvama vrste *T. arntzeni*, a po trajanju larvenog perioda su između *T. dobrogicus* i *T. arntzeni*.
- Veliki mrmoljci se razlikuju po obliku tela još tokom larvenog razvića, tj. barem od trenutka kada su larve potpuno formirane (starosti 75 dana). Vrste se razlikuju i u stopi promena oblika tela larvi. Međutim, tokom metamorfoze kao i kod juvenilnih jedinki, dolazi do konvergencije u ovim



osobinama. Na osnovu razlika u morfologiji između vrsta, *T. dobrogicus* i *T. cristatus* su sličniji jedan drugom, naročito u obliku larvi, kao i u stopi ontogenetskih promena, ali se razlikuju od *T. arntzeni* i *T. macedonicus*. Dinamika varijansi u obliku tela velikih mrmoljaka tokom ontogenija odvaja dva perioda sa kanalisanim razvićem: kod larvi starosti 75 dana i kod tek metamorfoziranih juvenilnih jedinki. Mala varijansa i odsustvo razlika u veličini i obliku između vrsta, izdvaja ovaj stupanj razvića kao specifični „juvenilni filotipski period“.

- Rezultati dobijeni u ovoj tezi ukazuju na metamorfozu kao ključni događaj u tranziciji oblika tela na prelasku iz vodene u terestričnu sredinu koja „resetuje“ različite ontogenetske putanje larvi svake vrste velikih mrmoljaka.
- Mapiranjem odlika životne istorije na filogenetsko stablo velikih mrmoljaka može se zaključiti da je vrsta *T. dobrogicus* sa najviše autopomorfizama u osobinama životne istorije, uključujući i obliku tela larvi. Sa druge strane, vrsta *T. arntzeni*, koja se nalazi u osnovi filogenetskog stabla, odlikujući se pleziomorfnim stanjima odlika životne istorije. Tako su veća jaja, manji odnos zapremina galerte i vitelusa, veća dužina izvaljenih larvi, kraće trajanje embrionalnog perioda predačke osobine životne istorije velikih mrmoljaka.

## LITERATURA

- Adams M.J., Schindler D.E., Bury R.B. 2001. Association of amphibians with attenuation of ultraviolet-B radiation in montane ponds. *Oecologia* 128: 519-525.
- Alberch P., Gould S.J., Oster G.F., Wake D.B. 1979. Size and shape in ontogeny and phylogeny. *Paleobiology* 5: 296-317.
- Arntzen J.W. 2000. A growth curve for the newt *Triturus cristatus*. *Journal of Herpetology* 34: 227-232.
- Arntzen J.W. 2003. *Triturus cristatus* Superspezies - Kammolch-Artenkreis. (*Triturus cristatus* (Laurenti, 1768) - Noerdlicher Kammolch, *Triturus carnifex* (Laurenti, 1768) - Italienischer Kammolch. *Triturus dobrogicus* (Kiritzescu, 1903) - Donau-Kammolch, *Triturus karelinii* (Strauch, 1870) - Suedlicher Kammolch). In: Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. (eds. Eds. K. Grossenbacher & B. Thiesmeier), Band 4/IIA: Schwanzlurche (Urodela) IIA. Aula-Verlag, Wiebelsheim, pp. 421-514.
- Arntzen J.W., Wallis G.P. 1999. Geographic variation and taxonomy of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies): morphological and mitochondrial DNA data. *Contributions to Zoology* 68: 181-203.
- Arntzen J.W., Espregueira Themudo G., Wielstra B. 2007. The phylogeny of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies): nuclear and mitochondrial genetic characters suggest a hard polytomy, in line with the paleogeography of the centre of origin. *Contributions to Zoology* 76: 261-278.
- Badyaev A.V., Martin T.E. 2000. Individual variation in growth trajectories: phenotypic and genetic correlations in ontogeny of the house finch

- (*Carpodacus mexicanus*). *Journal of the Evolutionary Biology* 13: 290–301.
- Baker J. 1988. Maintenance breeding of *Triturus karelinii*. *British Herpetological Society Bulletin* 25: 42-44.
- Bernardo J. 1996. The particular maternal effect of propagule size, especially egg size: patterns, models, quality of evidence and interpretations. *American Zoologist* 36: 216-236.
- Berven K.A. 1982. The genetic basis of altitudinal variation in the wood frog *Rana sylvatica*. I. An experimental analysis of life history traits. *Evolution* 36: 962-983.
- Berven K.A., Chadra B.G. 1988. The relationship among egg size, density and food level on larval development in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Oecologia* 75: 67-72.
- Bishop C.D., Erezyilmaz D.F., Flatt T., Georgiou C.D., Hadfield M.G., Heyland A., Hodin J., Jacobs M.W., Maslakova S.A., Pires A., Reitzel A.M., Santagata S., Tanakay K., Youson J.H. 2006. What is metamorphosis? *Integrative and Comparative Biology* 46: 655–661.
- Blomberg S.P., Garland T. Jr., Ives A.R. 2003. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution* 57: 717-745.
- Bookstein F.L. 1991. *Morphometric tools for landmarks data: geometry and biology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bookstein F.L. 1997. Landmark methods for forms without landmarks: localizing group differences in outline shape. *Medical Image Analysis* 1: 225–243.
- Callan H.G., Spurway H. 1951. A study of meiosis in interracial hybrids of the newt, *Triturus cristatus*. *Journal of Genetics* 50: 235-249.

- Cheverud J.M., Wagner G.P., Dow M.M. 1989. Methods for the comparative analysis of variation patterns. *Systematic Zoology* 38: 201-213.
- Chipman A.D., Haas A., Tchernov E., Khaner O. 2000. Variation in anuran embryogenesis: differences in sequence and timing of early developmental events. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)* 288: 352-365.
- Coddington J.A. 1988. Cladistic Tests of Adaptational Hypotheses. *Cladistics* 4: 3-20.
- Cohen M., Yeheskely-Hayon D., Warburg M.R., Davidson D., Halevi G., Sharon R. 2006. Differential growth identified in salamander larvae half-sib cohorts: survival strategy? *Development, Growth & Differentiation* 48: 537-548.
- Cogalniceanu D., Miaud C. 2002. Age, survival and growth in *Triturus dobrogicus* (Amphibia, Urodela) from the lower Danube floodplain. *International Association of Danube Research* 34: 777-783.
- Cogalniceanu D., Miaud C. 2003. Population age structure and growth in four syntopic amphibian species inhabiting a large river floodplain. *Canadian Journal of Zoology* 81: 1096-1106.
- Crawford C.B., Anderson J.L. 1989. Sociobiology, an environmentalist discipline? *American psychologist* 44: 1449-1459.
- Crnobrnja-Isailović J., Džukić G., Krstić N., Kalezić M.L. 1997. Evolutionary and paleogeographical effects on the distribution of the *Triturus cristatus* superspecies in the central Balkans. *Amphibia-Reptilia* 18: 321-332.
- Cvetković, D., M.L. Kalezić, A. Djorović, G. Džukić 1996. The crested newt (*Triturus carnifex*) in Submediterranean: reproductive biology, body size and age. *Italian Journal of Zoology*, 63:107-111.

- D'Amen M., Vignoli L., Bologna M.A. 2006. The normal development and the chromosome No. 1 syndrome in *Triturus carnifex carnifex* (Caudata, Salamandridae). *Italian Journal of Zoology* 73: 325-333.
- D'Amen M., Vignoli L., Bologna M.A. 2007. The effects of temperature and pH on the embryonic development of two species of *Triturus* (Caudata: Salamandridae). *Amphibia-Reptilia* 28: 295-300.
- Denver R.J. 1997. Proximate Mechanisms of Phenotypic Plasticity in Amphibian Metamorphosis. *American Zoologist* 37: 172-184.
- Duellman W.E., Trueb L. 1994. *Biology of amphibians*. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press.
- Džukić G. 1993. *Fauna, zoogeografija i zaštita repatih vodozemaca (Caudata) Srbije*. Doktorska disertacija, Beograd, Univerzitet u Beogradu.
- Efron B., Tibshirani R.J. 1993. *An introduction to the bootstrap*. Chapman and Hall.
- Espregueira Themudo G., Wielstra B., Arntzen J.W. 2009. Multiple nuclear and mitochondrial genes resolve the branching order of a rapid radiation of crested newts (*Triturus*, Salamandridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 321-328.
- Falster D.S., Warton D.I., Wright I.J. 2006. SMATR: Standardised Major Axis Tests and Routines, vers. 2.0. <http://www.bio.mq.edu.au/ecology/SMATR/>
- Felsenstein J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist* 125: 1-15.
- Fernandez C.J. 1992. Residual Analysis and data transformations: Important tools in statistical analysis. *HortScience* 27: 297-300.

- Fischer-Rousseau L., Cloutier R., Zelditch M.L. 2009. Morphological integration and developmental progress during fish ontogeny in two contrasting habitats. *Evolution and Development* 11: 740–753.
- Garcia-Paris M., Montori A., Herrero P. 2004. Fauna Iberica. Vol. 24. Amphibia. Lissamphibia. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Garfield, D.A., Wray G.A. 2009. Comparative embryology without a microscope: using genomic approaches to understand the evolution of development. *Journal of Biology*, 8:65.
- Geller S. 1983. *Statistique*. Paris: Masson.
- Gilbert L.I., Frieden E. 1981. *Metamorphosis: a problem in developmental biology*. Plenum press, New York.
- Givnish T.J., Sytsma K.J. 1997. *Molecular evolution and adaptive radiation*. Cambridge University Press, UK.
- Glücksohn S. 1932. Äussere entwicklung der extremitäten und stadieneinteilung der larvenperiode von triton taeniatus leyd. und triton cristatus laur. *Arch. Entw. Mech. Org.* 125: 341-405.
- Gozzo S., Casetti R., Taglioni A., Meloni M., Monaco V. 1999. The metamorphosis in *Triturus vittatus ophryticus* and *Triturus carnifex*: two different life histories. *Russian Journal of Herpetology* 6: 107-114.
- Griffiths R. 1996. *Newts and salamanders of Europe*. London: T & AD Poyser.
- Griffiths R.A., de Wijer P. 1994. Differential effects of pH and temperature on embryonic development in the British newts (*Triturus*). *Journal of Zoology*, London 234: 613-622.

- Gvozdik L., Van Damme R. 2006. Triturus newts defy the running-swimming dilemma. *Evolution* 60: 2110-2121.
- Hall B.K. 1999. *Evolutionary Developmental Biology*. 2<sup>nd</sup> ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Hall B.K. 2003. Evolution as the control of development by ecology. Introduction in: Muller G.B., Wagner G.P., Callebaut W., eds. *Environment, Development and Evolution: Toward a Synthesis*. (The Vienna Series in Theoretical Biology), a Bradford Book, Massachusetts.
- Hall B.K., Wake M.H. 1999. *The origin and evolution of larval forms*. Academic press, San Diego.
- Hallgrímsson B. 1999. Ontogenetic patterning of skeletal fluctuating asymmetry in rhesus macaques and humans: evolutionary and developmental implications. *International Journal of Primatology* 20: 121–151.
- Hallgrímsson B., Wilmore K., Hall B.K. 2002. Canalization, developmental stability, and morphological intergration in primate limbs. *Yearbook of Physical Anthropology* 45: 131–158.
- Halliday T.R., 1977. The courtship of European newts. An evolutionary perspective. In: Taylor D.H., Guttman S.I. (eds.), *The Reproductive Biology of Amphibians*. Plenum, New York, pp. 185-232.
- Hansen T.F., Martins E.P. 1996. Translating between microevolutionary process and macroevolutionary patterns: The correlation structure of interspecific data. *Evolution* 50: 1404-1417.
- Hendrikse J.L., Parsons T.E., Hallgrímsson B. 2007. Evolvability as the proper focus of evolutionary developmental biology. *Evolution and Development* 9: 393–401.

- Herrel A., Huyghe K., Vanhooydonck B., Backeljau T., Breugelmans K., Grbac I., Van Damme R., Irschick D.J. 2008. Rapid large-scale evolutionary divergence in morphology and performance associated with exploitation of a different dietary resource. *Proceedings of the National Academy of Science* 105: 4792-4795.
- Heyland A., Hodin J., Reitzel A.M. 2004. Hormone signaling in evolution and development: a non model system approach. *BioEssays* 27: 64–75.
- Hood G. 2004. Poptools, ver. 2.62. CSIRO, Canberra. <http://www.cse.csiro.au/poptools>.
- Ficetola, G.F., S. Scali, M. Denoël, G. Montanaro, T. D. Vukov, M.A. L. Zuffi, E. Padoa-Schioppa (2010). Ecogeographical variation of body size in amphibians: comparing the hypotheses using the newt *Triturus carnifex*. *Global Ecology and Biogeography*, 19:485-495.
- Istock C.A. 1967. The evolution of complex life cycle phenomena: an ecological perspective. *Evolution* 21: 592-605.
- Ivanović A., Vukov T.D., Džukić G., Tomašević N., Kalezić M.L. 2007. Ontogeny of skull size and shape changes within a framework of biphasic lifestyle: a case study in six *Triturus* species (Amphibia, Salamandridae). *Zoomorphology* 126: 173–183.
- Ivanović A., Sotiropoulos K., Vukov T.D., Eleftherakos K., Džukić G., Polymeni R., Kalezić M.L. 2008a. Cranial shape variation and molecular phylogenetic structure of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies: Caudata, Salamandridae) in the Balkans. *Biological Journal of the Linnean Society* 95: 348-360.
- Ivanović A., Tomašević N., Džukić G., Kalezić M.L. 2008b. Evolutionary diversification of the limb skeleton in crested newts (*Triturus cristatus*



- superspecies, Caudata, Salamandridae). *Annales Zoologici Fennici* 45: 527-535.
- Kalezić M.L., Hedgecock D. 1980. Genetic variation and differentiation of tree common European newts (*Triturus*) in Yugoslavia. *British Journal of Herpetology* 6: 49-57.
- Kalezić M.L., Džukić G., Stamenković S., Crnobrnja J. 1989. Morphometrics of the crested newt (*Triturus cristatus* complex) from Yugoslavia: relevance for taxonomy. *Archive of Biological Science* 41: 17-37.
- Kalezić M.L., Crnobrnja J., Đorović A., Džukić G. 1992. Sexual size difference in *Triturus* newts: geographical variation in Yugoslav populations. *Alytes* 10: 63-80.
- Kalezić M.L., Cvetković D., Đorović A., Džukić G. 1994. Paedomorphosis and differences in life-history traits of two neighbouring crested newt (*Triturus carnifex*) populations. *Herpetological Journal* 4: 151-158.
- Kalezić M.L., Džukić G., Mesaroš G., Crnobrnja-Isailović J. 1997. The crested newt (*Triturus cristatus* supespecies) in ex-Yugoslavia: morphological structuring and distribution patterns. *University Thought* 4: 39-46.
- Kaplan, R.H. 1980. The implications of ovum size variability for offspring fitness and clutch size within several populations of salamanders (*Ambystoma*). *Evolution* 34: 51-64.
- Kaplan R.H., Salthe S.N. 1979. The allometry of reproduction: an empirical view in salamanders. *American Naturalist* 113: 671-689.
- Kaplan R.H., King E.G. 1997. Egg size is a developmentally plastic trait: evidence from long term studies in the frog *Bombina orientalis*. *Herpetologica* 53: 149-165.

- Klingenberg C.P. 1998. Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biological Review* 73: 79–123.
- Klingenberg C.P. 2004. Integration, modules and development: molecules to morphology to evolution. In: *Phenotypic Integration: Studying the Ecology and Evolution of Complex Phenotypes*. M. Pigliucci & K. Preston (eds.), pp. 213–230. New York, Oxford University Press.
- Knight F.C.E. 1939. Die Entwicklung von *Triturus alpestris* bei verschiedenen Temperaturen. Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik 137: 461-473.
- Kohmatsu Y., Shigeru N., Yamamura N. 2001. Effects of head shape variation on growth, metamorphosis and survivorship in larval salamanders (*Hynobius retardatus*). *Ecological Research* 16: 73–83.
- Krizmanić, I., T.D. Vukov, M.L. Kalezić 2005. Bergmann's rule is size-related in European Newts (*Triturus* spp., Caudata). *The Herpetological Journal*, 15:205-206.
- Lanza B., Arntzen J.W., Gentile E. 2010. Vertebral numbers in the Caudata of the western Palaearctic (Amphibia). *Atti del Museo Civico di Storia Naturale - Trieste* 54: 3-114.
- Laurila A., Karttunen S., Merilä J. 2002. Adaptive phenotypic plasticity and genetics of larval life histories in two *Rana temporaria* populations. *Evolution* 56: 617-627.
- Licht L.E., Grant K.P. 1997. The effects of ultraviolet radiation on the biology of amphibians. *American Zoologist* 37: 137-145.
- Litvinchuk S.N., Borkin L.J. 2002. Distribution, ecology and conservation status of the Danube crested newt (*Triturus dobrogicus*) in Ukraine and Moldavia. *Vestnik Zoologii* 36: 35-44.
- Litvinchuk S.N., Zuiderwijk A., Borkin L.J., Rosanov J.M. 2005. Taxonomic status of *Triturus vittatus* (Amphibia: Salamandridae) in western Turkey: trunk

- vertebrae count, genome size and allozyme data. *Amphibia-Reptilia* 26: 305-323.
- Litvinchuk S.N., Rosanov J.M., Borkin L.J. 2007. Correlations of geographic distribution and temperature of embryonic development with the nuclear DNA content in the Salamandridae (Urodela, Amphibia). *Genome* 50: 333-342.
- Loman J. 2002. Microevolution and maternal effects on tadpole *Rana temporaria* growth and development rate. *Journal of Zoology* 257: 93-99.
- Losos J.B. 2010. Adaptive Radiation, Ecological Opportunity, and Evolutionary Determinism. *American naturalist* 175: 623-639.
- Lytle D.A. 2001. Disturbance regimes and life-history evolution. *American Naturalist* 157: 525-536.
- Maier W. 1999. On the evolutionary biology of early mammals—with methodological remarks on the interaction between ontogenetic adaptation and phylogenetic transformation. *Zoologischer Anzeiger* 338: 55–74.
- Marco A., Lizana M., Alvarez A., Blaustein A.R. 2001. Egg-wrapping behaviour protects newt embryos from UV radiation. *Animal behaviour* 61: 639-644.
- Marroig G., Cheverud J.M. 2001. A comparison of phenotypic variation and covariation patterns and the role of phylogeny, ecology and ontogeny during cranial evolution of new world monkeys. *Evolution* 55: 2576-2600.
- Miaud C. 1994. Role of wrapping behaviour on egg survival in three species of *Triturus* (Amphibia: Urodela). *Copeia* 1994: 535-537.
- Miaud C., Guyetant R., Elmberg J. 1999. Variations in life-history traits in the common frog *Rana temporaria* (Amphibia: Anura): a literature review and new data from the French Alps. *Journal of Zoology* 249: 61-73.

- Miaud C., Guyétant R., Faber H. 2000. A review of life history traits of alpine newts (Amphibians: Urodela; *Triturus alpestris*) in response to environmental variations. *Herpetologica* 56: 131-140.
- Miaud C., Merila J. 2001. Local adaptation or environmental induction? Population differentiation in alpine amphibians. *Biota* 54: 31-51.
- Milner A.R. 1988. The Biogeography of Salamanders in the Mesozoic and Early Caenozoic: a Cladistic-Vicariance Model. – in: Sims, R.W, Price, J.H. & Whalley, P.E.S. „Evolution, time and space: The Emergence of the Biosphere“, Academic Press, London, Orlando, San Diego, New York, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo (1983); in russian Progress, Moskwa, pp.368-399. & 457-459.
- Mitteroecker P., Gunz P. 2009. Advances in geometric morphometrics. *Evolutionary Biology* 36: 235-247.
- Newman R.A. 1992. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis. What type of phenotypic variation is adaptive, and what are the costs of such plasticity. *BioScience* 42: 671-678.
- Orizaola G., Braña F. 2003. Oviposition behaviour and vulnerability of eggs to predation in four newt species (genus *Triturus*). *Herpetological journal* 13: 121-124.
- Orizaola G., Braña F. 2005. Plasticity in newt metamorphosis: the effect of predation at embryonic and larval stages. *Freshwater Biology* 50: 438-446.
- Palen W.J., Williamson C.E., Clauser A.A., Schindler D.E. 2005. Impact of UV-B exposure on amphibian embryos: linking species physiology and oviposition behavior. *Proceedings of the Royal Society B*. 272: 1227-1234.
- Partridge L., Harvey P.H. 1988. The ecological context of life history evolution. *Science* 241: 1449-1455.

- Pechenik J. A. 1999. On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles. *Marine Ecology Progress Series* 177: 269-297.
- Pechenik J.A. 2001. Life cycles. In *Evolutionary Ecology: Concepts and Case Studies* (eds. C.W. Fox, D.A. Roff & D.J. Fairbairn) Oxford University Press, New York.
- Rafińska A. 1991. Reproductive biology of the fire-bellied toads, *Bombina bombina* and *B. variegata* (Anura: Discoglossidae): egg size, clutch size and larval period length differences. *Biological Journal of the Linnean Society*. 43: 197-210.
- Rensch B. 1929. Das Prinzip geographischer Rassenkreise und das Problem der Artbildung. Börnträger, Berlin.
- Resetarits Jr. W.J. 1996. Oviposition site choice and life history evolution. *American Zoologist* 36: 205-215.
- Revell L.J., Harmon L.J., Collar D.C. 2008. Phylogenetic signal, evolutionary process, and rate. *Systematic Biology* 57: 591-601.
- Richardson M.K. 1999. Vertebrate evolution: the developmental origins of adult variation. *BioEssays* 21: 604-613.
- Ridley M. 2003. *Evolution*. Wiley-Blackwell.
- Roff D.A. 2002. *Life history evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Roff D.A. 2005. Variation and life history evolution. In *Variation* (ed. B. Hallgrímsson & B. K. Hall), pp. 333-355. New York: Elsevier Academic Press.
- Rohlf F.J. 2005. tpsDig program, Version 2.04, Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook. Available at <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.

- Rohlf F.J., Slice D.E. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology* 39: 40–59.
- Rose C.S. 1999. Hormonal control in larval development and evolution – Amphibians. In: *The origin and evolution of larval forms*: 167–217. Hall, K. & Wake, M.H. (Eds). San Diego, CA: Academic Press.
- Rowe L., Ludvig D. 1991. Size and timing of metamorphosis in complex life cycles: time constraints and variation. *Ecology* 72: 413-427.
- Ryser J. 1996. Comparative life histories of a low- and high-elevation population of the common frog *Rana temporaria*, by skeletochronology. *Journal of Zoology, London* 216: 673-685.
- Salthe S.N. 1967. Courtship patterns and the phylogeny of the urodeles. *Copeia* 1967: 100-117.
- Sheets, H.D. (2003). IMP - Integrated Morphometrics Package. Department of Physics. Canisius College, Buffalo. Available at <http://www3.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>.
- Sims S.H., Macgregor H.C., Pellatt P.S., Horner H.A. 1984. Chromosome I in crested and marbled newts (*Triturus*). *Chromosoma* 89: 169-185.
- Skelly D.K., Freidenburg L.K. 2000. Effects of beaver on the thermal biology of an amphibian. *Ecology Letters* 3: 483-486.
- Sol D., Duncan R.D., Blackburn T.M., Cassey P., Lefebvre L. 2005. Big brain, enhanced cognition, and response of birds to novel environments. *Proceedings of the National Academy of Science* 102: 5460-5465.
- Sorci G., Clobert J., Belichon S. 1996. Phenotypic plasticity of growth and survival in the common lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of animal ecology* 65: 781-790.

- Stearns S.C. 1976. Life-history tactics: a review of the ideas. *The quarterly review of biology* 51: 3-47.
- Stearns S.C. 1983a. The genetic basis of differences in life-history traits among six populations of mosquitofish (*Gambusia affinis*) that shared ancestors in 1905. *Evolution* 37: 618-627.
- Stearns S.C. 1983b. The influence of size and phylogeny on patterns of covariation in the life-history traits in the mammals. *Oikos* 41: 173-187.
- Stearns S.C. 1984. The effects of size and phylogeny on patterns of covariation in the life history traits of lizards and snakes. *The American Naturalist* 123: 56-72.
- Stearns S.C. 1989. Trade-offs in life history evolution. *Functional Ecology* 3: 259-268.
- Stearns S.C. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford university press, New York.
- Stearns S.C., 2000. Life history evolution: successes, limitations, and prospects. *Naturwissenschaften* 87: 476-486.
- Stearns S., de Jong G., Newman B. 1991. The effects of phenotypic plasticity on genetic correlations. *Trends in Ecology and Evolution* 6: 122-126.
- Steinfartz S., Vicario S., Arntzen J.W., Caccone A. 2007. A Bayesian approach on molecules and behavior: reconsidering phylogenetic and evolutionary patterns of the Salamandridae with emphasis on *Triturus* newts. *Journal of Experimental Zoology (mol evo devo)* 306B: 1-24.
- Strauss R.E., Altig R. 1992. Ontogenetic body form changes in three ecological morphotypes of anuran tadpoles. *Growth, Development and Aging* 56: 3-16.

- Tucić N. 2003. Evolucionarna biologija. NNK – International, Beograd.
- Uzum N., Olgun K. 2009. Age and growth of the southern crested newt, *Triturus karelinii* (Strauch 1870), in a lowland population from northwest Turkey. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 55: 55-65.
- Van Buskirk J. 2009. Natural variation in morphology of larval amphibians: Phenotypic plasticity in nature? *Ecological Monographs* 79: 681–705.
- Vukov T.D., Ivanović A., Tomašević N., Džukić G., Kalezić M.L. 2007. Braincase-body size relations in European newts (*Triturus* spp.: Salamandridae: Caudata): Does the size matter? *Annales Zoologici Fennici* 44: 232-239.
- Wake D.B. 2009. What salamanders have thought us about evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40: 333-352.
- Wallace H. 1987. Abortive development in the crested newt *Triturus cristatus*. *Development* 100: 65-72.
- Wallis G.P., Arntzen J.W. 1989. Mitochondrial-DNA variation in the crested newt supespecies: limited cytoplasmic gene flow among species. *Evolution* 43: 88-104.
- Warton D.L., Wright I.J., Falster D.S., Westoby M. 2006. Bivariate line-fitting methods for allometry. *Biological Review* 81: 259-291.
- Weisrock D.W., Harmon L.J., Larson A. 2005. Resolving the deep phylogenetic relationships among salamander families: analyses of mitochondrial and nuclear genomic data. *Systematic Biology* 54: 758-777.
- Weitere M., Tautz D., Neumann D., Steinfartz S. 2004. Adaptive divergence vs. environmental plasticity: tracing local genetic adaptation of metamorphosis traits in salamanders. *Molecular Ecology* 13: 1665-1677.



- Wielstra B., Espregueira Themudo G., Güçlü Ö., Olgun K., Poyarkov N.A., Arntzen J.W. 2010. Cryptic crested newt diversity at the Eurasian transition: the mitochondrial DNA phylogeography of Near Eastern *Triturus* newts. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 888-896.
- 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. *Science* 182: 1305-1314.
- Winemiller K.O., Rose K.A. 1992. Patterns of life-history diversification in north american fishes: implications for population regulation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 49: 2196-2218.
- Wray G.A. 2000. The evolution of embryonic patterning mechanisms in animals. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 11: 385-393.
- Zelditch M.L., Caramichael A.C. 1989. Ontogenetic variation in patterns of phenotypic integration in the laboratory rat. *Evolution* 43: 814–824.
- Zelditch M.L., Sheets H.D., Fink W.L. 2000. Spatiotemporal reorganization of growth rates in the evolution of ontogeny. *Evolution* 54: 1363-1371.
- Zelditch M.L., Lundrigan B.L., Sheets D.H., Garland T.Jr. 2003. Do precocial mammals develop at a faster rate? A comparison of rates of skull development in *Sigmodon fulviventer* and *Mus musculus domesticus*. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 708–720.
- Zhang P., Papenfuss T.J., Wake M.H., Qu L., Wake D.B. 2008. Phylogeny and biogeography of the family Salamandridae (Amphibia: Caudata) inferred from complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 586-597.

## 6. PRILOG I

**Tabela 1.** Deskriptivna statistika mera jaja za četiri vrste analiziranih velikih mrmoljača po populacijama. SV – srednja vrednost, SD – standardna devijacija, CV – koeficijent varijacije.

Vrsta	Populacija	Broj jaja	Zapremina galerte			Zapremina vitelusa			Odnos zapremina gal/vit		
			SV	SD	CV %	SV	SD	CV %	SV	SD	CV %
<i>T. macedonicus</i>	Ceklin	575	14.904	2.689	18.042	5.099	0.873	17.116	2.995	0.692	23.115
<i>T. macedonicus</i>	Rid	488	11.484	1.751	15.246	4.614	0.774	16.785	2.540	0.480	18.905
<i>T. macedonicus</i>	Progonovići	273	16.154	2.352	14.558	5.590	1.256	22.467	2.995	0.631	21.050
<i>T. cristatus</i>	Miroč	291	14.160	3.671	25.926	3.463	0.699	20.193	4.191	1.153	27.505
<i>T. cristatus</i>	Vršački breg	80	13.408	2.141	15.969	3.645	1.023	28.066	3.920	1.123	28.656
<i>T. dobrogicus</i>	Kikinda	735	8.909	2.410	27.050	1.936	0.424	21.875	4.753	1.430	30.093
<i>T. dobrogicus</i>	Opovo	141	16.445	4.910	29.859	4.054	1.785	44.029	4.371	1.209	27.666
<i>T. arntzeni</i>	pirot	450	17.078	3.423	20.046	5.002	1.023	20.454	3.508	0.796	22.682

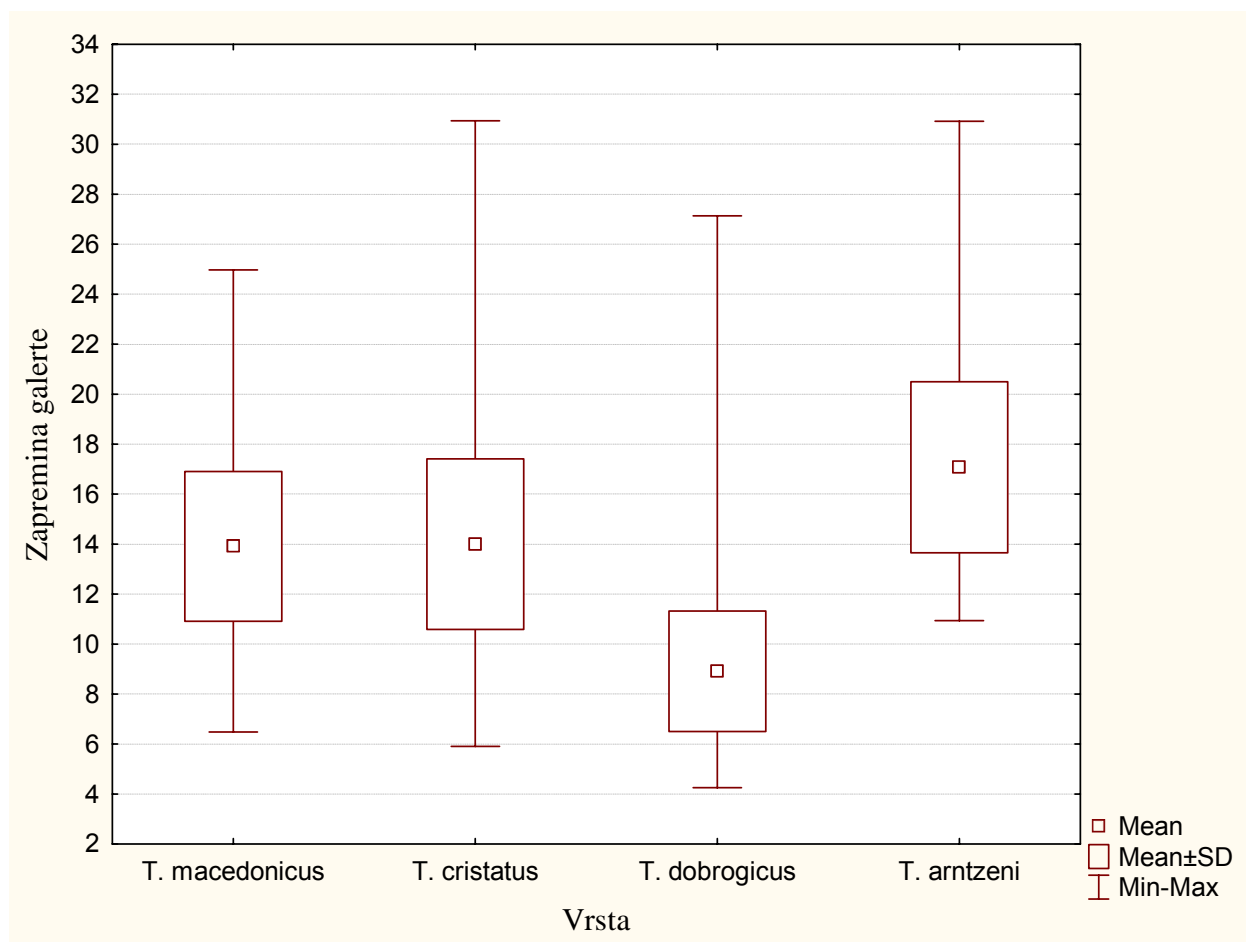
**Tabela 2.** Deskriptivna statistika mera jaja za četiri vrste analiziranih velikih mrmoljaka po ženka. SV – srednja vrednost, SD – standardna devijacija, CV – koeficijent varijacije.

Vrsta	Ženka	Broj jaja	Zapremina galerte			Zapremina vitelusa			Odnos zapremina gal/vit		
			SV	SD	CV %	SV	SD	CV %	SV	SD	CV %
<i>T. macedonicus</i>	B6	190	14.856	2.214	14.90	4.667	0.704	15.09	3.244	0.635	19.56
<i>T. macedonicus</i>	C6	141	12.706	2.038	16.04	5.259	0.887	16.86	2.482	0.574	23.10
<i>T. macedonicus</i>	D6	71	15.358	2.519	16.40	4.855	0.750	15.44	3.230	0.664	20.54
<i>T. macedonicus</i>	E6	173	16.562	2.443	14.75	5.544	0.823	14.84	3.044	0.634	20.81
<i>T. macedonicus</i>	G6	488	11.484	1.751	15.25	4.614	0.774	16.78	2.540	0.480	18.91
<i>T. macedonicus</i>	H6	77	17.333	2.382	13.74	6.782	1.204	17.75	2.627	0.549	20.91
<i>T. macedonicus</i>	I6	196	15.691	2.177	13.87	5.122	0.924	18.04	3.140	0.602	19.17
<i>T. cristatus</i>	A7	76	15.536	3.723	23.96	3.712	0.660	17.78	4.297	1.221	28.41
<i>T. cristatus</i>	B7	15	13.161	1.421	10.80	3.953	0.794	20.10	3.426	0.661	19.28
<i>T. cristatus</i>	C7	14	12.827	4.642	36.19	2.676	0.447	16.72	4.768	1.521	31.90
<i>T. cristatus</i>	D7	46	15.290	3.500	22.89	3.566	0.475	13.31	4.337	1.049	24.18
<i>T. cristatus</i>	E7	66	12.420	2.011	16.19	3.376	0.666	19.74	3.796	0.908	23.93
<i>T. cristatus</i>	F7	29	17.083	4.634	27.13	3.824	0.449	11.73	4.525	1.300	28.73
<i>T. cristatus</i>	G7	36	11.915	2.520	21.15	2.713	0.460	16.95	4.495	1.163	25.88
<i>T. cristatus</i>	H5	19	14.029	2.017	14.38	5.089	0.867	17.04	2.837	0.657	23.14
<i>T. cristatus</i>	H7	9	12.825	2.093	16.32	3.704	0.628	16.97	3.515	0.637	18.11
<i>T. cristatus</i>	J5	15	12.096	1.289	10.66	3.279	0.636	19.39	3.812	0.794	20.84
<i>T. cristatus</i>	K5	11	12.267	2.643	21.54	3.337	0.303	9.07	3.714	0.993	26.73
<i>T. cristatus</i>	L5	35	13.991	2.003	14.32	3.116	0.546	17.51	4.618	0.989	21.42

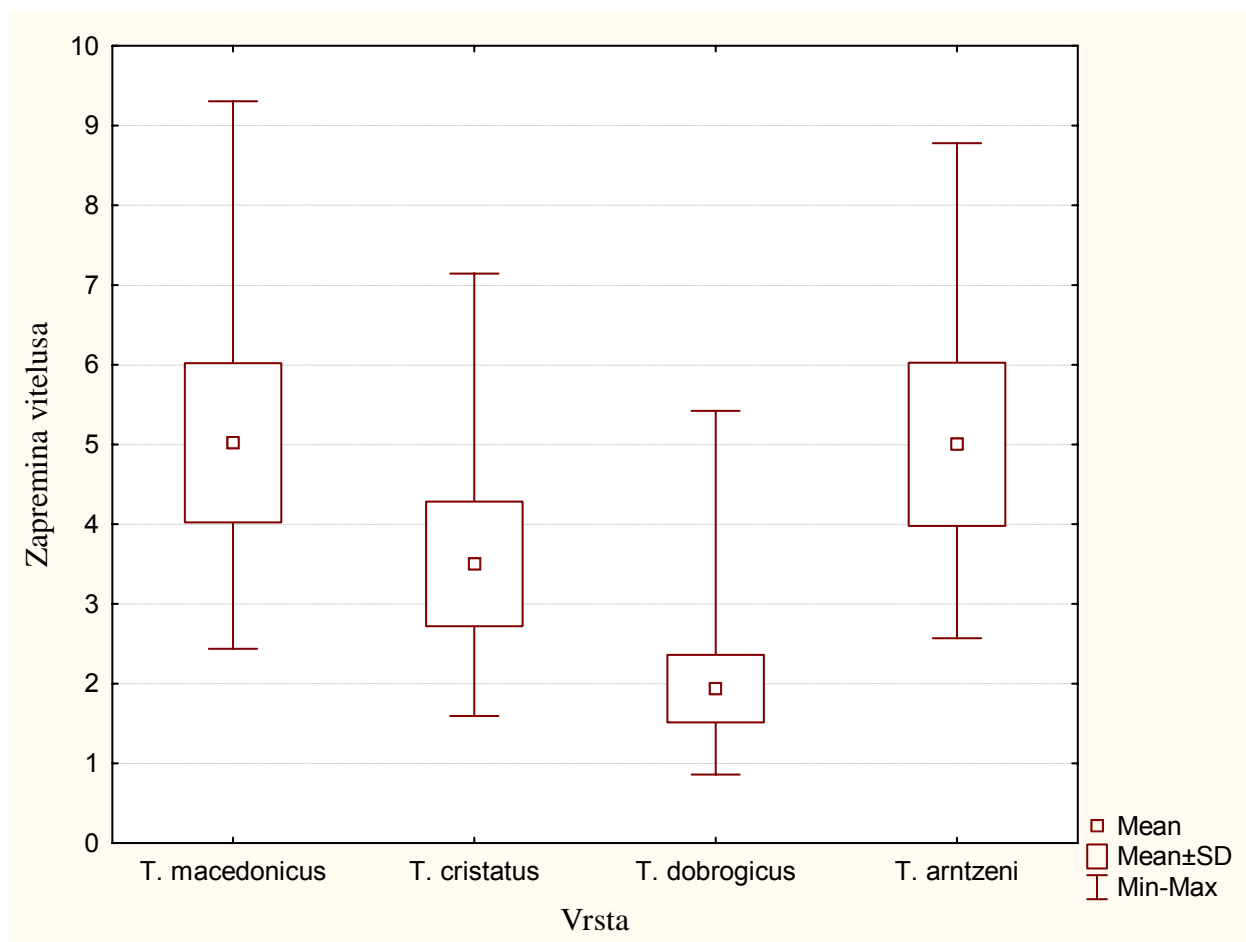
**Tabela 2 (nastavak).** Deskriptivna statistika mera jaja za četiri vrste analiziranih velikih mrmoljača po ženka. *SV* – srednja vrednost, *SD* – standardna devijacija, *CV* – koeficijent varijacije.

Vrsta	Ženka	Broj jaja	Zapremina galerte			Zapremina vitelusa			Odnos zapremina gal/vit		
			SV	SD	CV %	SV	SD	CV %	SV	SD	CV %
<i>T. dobrogicus</i>	A4	362	9.734	2.624	26.95	2.054	0.435	21.16	4.886	1.502	30.73
<i>T. dobrogicus</i>	B4	168	9.249	1.628	17.60	1.765	0.316	17.88	5.367	1.160	21.61
<i>T. dobrogicus</i>	C4	74	6.989	1.150	16.45	1.681	0.374	22.26	4.352	1.172	26.94
<i>T. dobrogicus</i>	E4	99	7.541	1.695	22.47	1.994	0.429	21.52	3.943	1.203	30.51
<i>T. dobrogicus</i>	G4	32	6.460	1.160	17.95	1.914	0.331	17.30	3.459	0.817	23.63
<i>T. dobrogicus</i>	A	38	20.173	3.905	19.36	5.931	1.992	33.58	3.711	1.193	32.15
<i>T. dobrogicus</i>	B	18	11.992	2.958	24.67	2.657	0.581	21.86	4.602	0.974	21.18
<i>T. dobrogicus</i>	C	14	9.338	2.303	24.67	2.578	0.703	27.29	3.700	0.709	19.17
<i>T. dobrogicus</i>	D	49	16.456	3.722	22.62	3.700	1.144	30.91	4.694	1.235	26.31
<i>T. dobrogicus</i>	F	21	18.320	3.594	19.62	3.732	0.854	22.89	5.013	0.937	18.68
<i>T. arntzeni</i>	A3	31	15.709	2.556	16.27	6.209	1.044	16.81	2.602	0.628	24.14
<i>T. arntzeni</i>	B3	35	17.034	2.439	14.32	4.731	0.865	18.28	3.667	0.562	15.33
<i>T. arntzeni</i>	C3	168	15.617	2.449	15.68	4.708	0.818	17.39	3.413	0.801	23.48
<i>T. arntzeni</i>	D3	159	16.637	2.177	13.08	4.751	0.857	18.04	3.606	0.772	21.41
<i>T. arntzeni</i>	E3	57	23.385	2.668	11.41	6.079	0.902	14.83	3.912	0.623	15.91

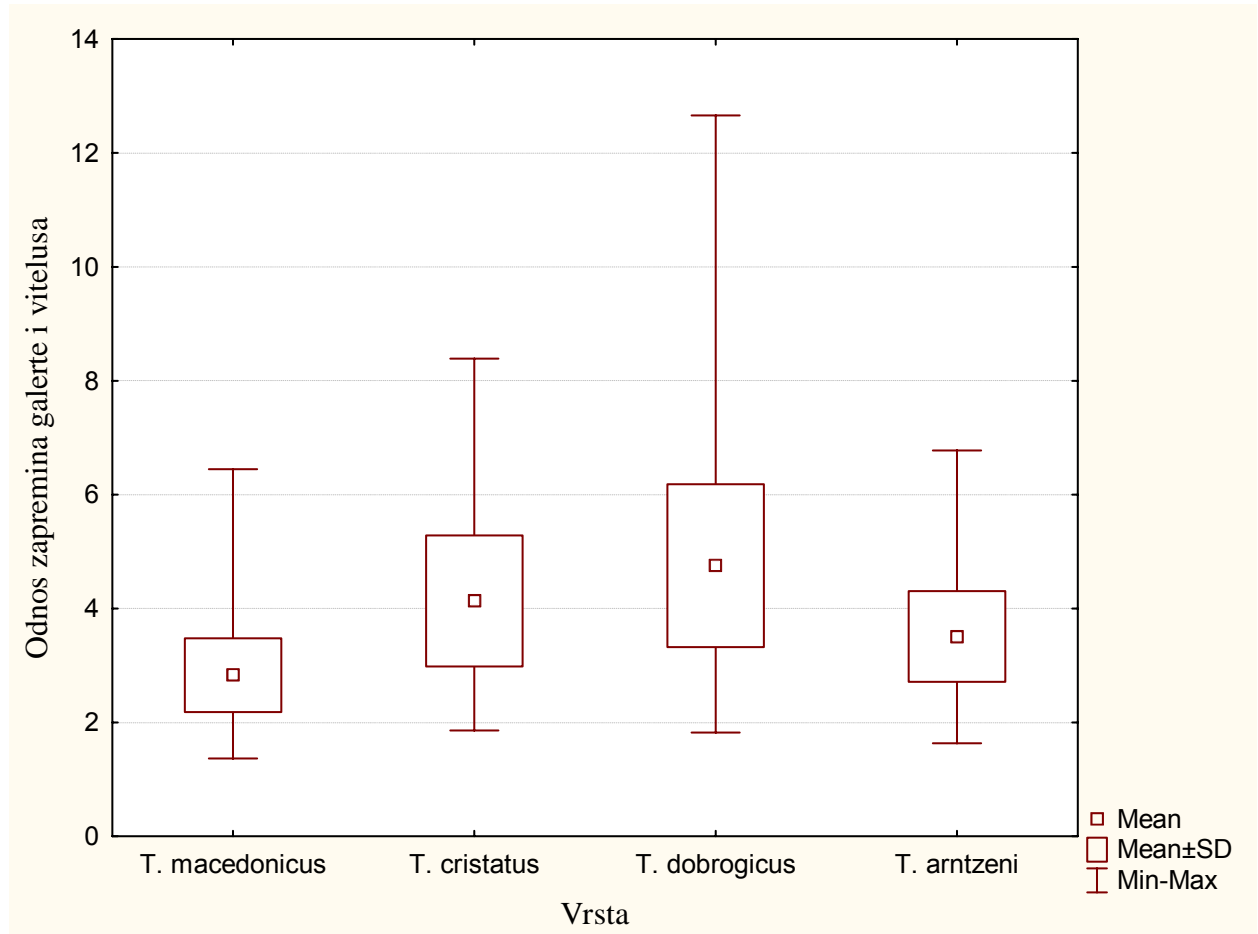
**Slika 1.** Grafički prikaz zapremine galerte za analizirane vrste velikih mrmoljača. Srednja vrednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrednosti.



**Slika 2.** Grafički prikaz zapremina vitelusa za analizirane vrste velikih mrmoljaka. Srednja vrednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrednosti.

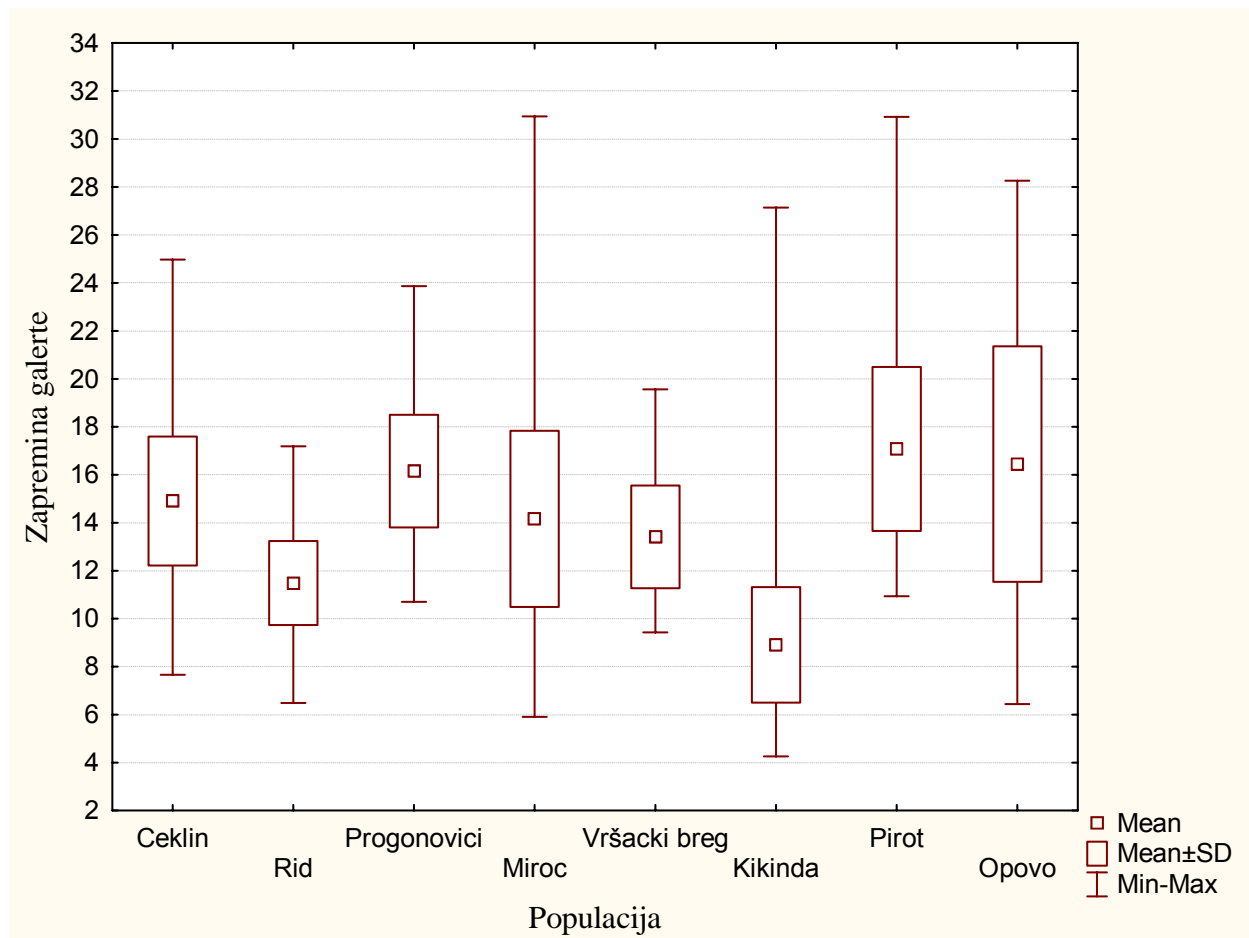


**Slika 3.** Grafički prikaz odnosa zapremine vitelusa i galerte za analizirane vrste velikih mrmoljaka. Srednja vrednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrednosti.

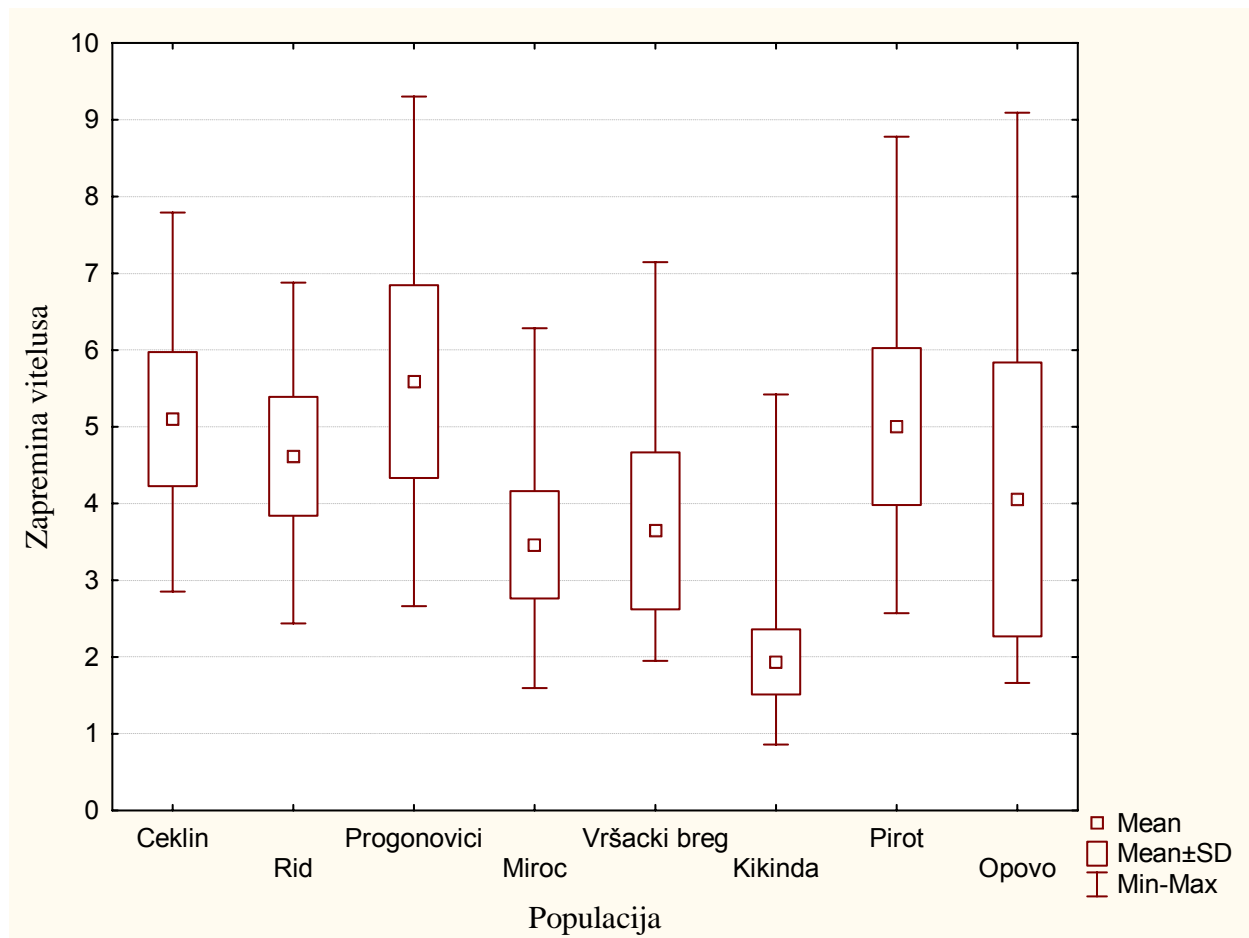




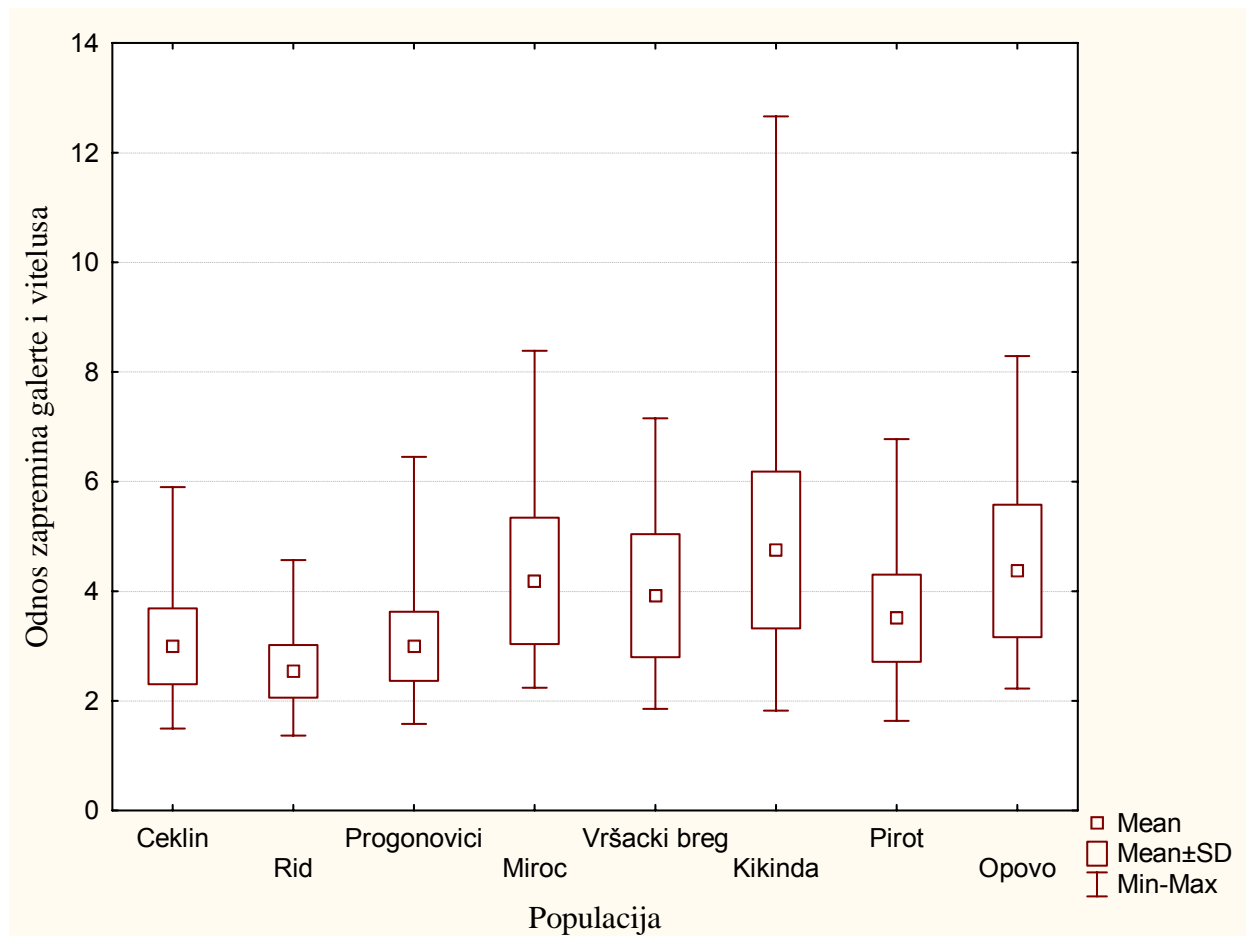
**Slika 4.** Grafički prikaz zapremina galerte za analizirane vrste velikih mrmoljača po populacijama. Srednja vrednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrednosti.



**Slika 5.** Grafički prikaz zapremine vitelusa za analizirane vrste velikih mrmoljaka po populacijama. Srednja vrednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrednosti.



**Slika 6.** Grafički prikaz odnosa zapremina vitelusa i galerte za analizirane vrste velikih mrmoljaka po populacijama. Srednja vrednost, standardna devijacija i minimalne i maksimalne vrednosti.



## 7. PRILOG II