

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

NATAŠA M. TOMAŠEVIĆ KOLAROV

EVOLUCIJA EKSTREMITETA VELIKIH
MRMOLJAKA
(*TRITURUS CRISTATUS* COMPLEX,
SALAMANDRIDAE, CAUDATA)

Doktorska disertacija

BEOGRAD, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

NATAŠA M. TOMAŠEVIĆ KOLAROV

LIMB EVOLUTION IN CRESTED NEWTS
(*TRITURUS CRISTATUS* COMPLEX,
SALAMANDRIDAE, CAUDATA)

Doctoral Dissertation

BELGRADE, 2013

MENTOR:

**DR. MILOŠ KALEZIĆ, REDOVNI PROFESOR
BIOLOŠKI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU**

ČLANOVI KOMISIJE:

**DR. ANA IVANOVIĆ, VANREDNI PROFESOR
BIOLOŠKI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU**

**DR. VIDA JOJIĆ, NAUČNI SARADNIK
INSTITUT ZA BIOLOŠKA ISTRAŽIVANJA „SINIŠA STANKOVIĆ“
UNIVERZITET U BEOGRADU**

DATUM ODRBRANE:

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u okviru projekata osnovnih istraživanja Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije (173043,143052), u okviru Odeljenja za Evolucionu Biologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se mentoru i članovima komisije, dr Milošu Kaleziću, dr Ani Ivanović i dr Vidi Jojić na pomoći i sugestijama koje su doprinele kvalitetu ovog rada.

Evolucija ekstremiteta velikih mrmoljaka
(*Triturus cristatus* complex, Salamandridae, Caudata)

Rezime

Integracija, modularnost i razvojna ograničenja predstavljaju važne komponente fenotipske varijabilnosti. U ovoj tezi analiziran je uticaj ovih komponenti na morfološku evoluciju ekstremiteta pet vrsta velikih krestatih mrmoljaka.

Veliki krestasti mrmoljci predstavljaju važne model organizme za istraživanja u oblasti morfološke integracije i razvojnih ograničenja, posebno ako se analiziraju ekstremiteti. To je grupa blisko srodnih vrsta sa poznatim filogenetskim odnosima, i izraženom vezom između morfološke forme/tipa (oblika tela i dužine ekstremiteta) i preference prema akvatičnoj/terestričnoj sredini. Akvatične vrste se odlikuju izduženim telom i kratkim nogama, dok su vrste sa više terestričnim životnim stilom snažnije i robusnije građe sa dugim nogama. Takođe, kao grupa sa složenim životnim ciklusom, gde larveni, juvenilni i adultni stupanj imaju različite morfologije, ekološke sredine i preference, načine ishrane i lokomocije, veliki krestasti mrmoljci imaju posebno mesto u izučavanju ontogenetskih putanja tokom razvića. Ontogenetska promena niše i tranzicija između akvatične i terestrične sredine je povezana sa procesom metamorfoze. Iako ekstremiteti mrmoljaka ne prolaze kroz drastične promene strukture tokom tog procesa, funkcionalni zahtevi za efikasnom lokomocijom u te dve sredine su bitno različiti. Pretpostavka je da razlike između vrsta u pogledu stepena korišćenja akvatične tj. terestrične lokomocije, može biti faktor koji doprinosi razlikama u dužinama skeletnih elemenata i različitim obrascima korelacija između elemenata

ekstremiteta, oslikavajući adaptacije na različite uslove sredine i način života (više ili manje akvatičan-terestričan).

Analiza morfološke integracije i modularnosti je utvrdila postojanje dva važna aspekta variranja elemenata ekstremiteta velikih krestastih mrmoljaka. Odgovarajući ontogenetski stupnjevi su sličniji između vrsta nego sukcesivni ontogenetski stupnjevi u okviru jedne iste vrste, sa najvećim nivoom integracije u juvenilnom stupnju. Visoki nivo integracije prisutan u juvenilnom stupnju predstavlja funkciju brzog, koordinisanog rasta skeleta ekstremiteta tokom perioda u okviru koga sistemski hormoni imaju odlučujuću ulogu, dok je niska ukupna integracija na adultnom stupnju je najverovatnije rezultat mnogih lokalnih i globalnih-sistemskih faktora koji menjaju jedan drugome efekat u vremenu i prostoru, pri čemu bifazični životni ciklus sa različitim načinima lokomocije, imaju odlučujuću ulogu u ontogenetskim promenama morfološke integracije i modularnosti. Razlike u obrascima integracije između više akvatičnih i više terestričnih vrsta mrmoljaka su predstavljene nižim stepenom korelacija između homologih elemenata ekstremiteta, i povećanjem korelacija između elemenata unutar ekstremiteta kod terestričnih vrsta velikih mrmoljaka (kao *T. karelinii*), dok više akvatične vrste (kao *T. dobrogicus*) imaju suprotan obrazac variranja sa većim korelacijama između homologih elemenata ekstremiteta nego između elemenata unutar ekstremiteta.

Ova studija je pokazala važan uticaj razvojnih ograničenja u kreiranju morfološke varijabilnosti ekstremiteta velikih krestastih mrmoljaka. Uporedna analiza osifikacionih sekvenci ekstremiteta utvrdila je postojanje nekoliko sinapomorfni heterohroničnih promena kod velikih krestastih mrmoljaka, koje uključuju kašnjenje u sekvenci drugog prsta i ubrzanje metakarpalnog elementa III i metatarzalnog elementa V. Ove heterohronične promene nisu adaptivne ali su važne za razmatranje morfološke evolucije ekstremiteta kod velikih krestastih mrmoljaka jer uključuju promenu preaksijalne ka postaksijalnoj dominaciji u

razvojnoj sekvenci, koja nije poznata kod repatih vodozemaca. Analiza alometrijskih obrazaca variranja ekstremiteta velikih mrmoljaka je pokazala dva važna rezultata: osobenosti obrazaca rasta kod vrste *T. dobrogicus*, kao i zajednički obrazac rasta nakon završene metamorfoze kod svih vrsta velikih mrmoljaka. Ovi rezultati ukazuju na verovatni uticaj i ulogu kako prirodne selekcije, tako i unutrašnjih-razvojnih mehanizama koji regulišu variranje dužine ekstremiteta tokom diverzifikacije velikih mrmoljaka.

Obrasci variranja u basipodijumu su slični medju analiziranim vrstama sa većim variranjem u broju karpalnih nego tarzalnim elemenata. Značajan podatak ove studije je da je u basipodijumu vrste *T. dobrogicus* došlo do gubitka jednog od karpalnih elemenata (centrale 1). Specifičnost ekstremiteta dunavskog mrmoljka se dopunjuje i posebnim planom organizacije karpusa i tarzusa koji odlikuje nizak nivo osifikacije praćen rastresitim pakovanjem skeletnih lemenata. Sve ove odlike ukazuju na postojanje heterohronične promene (pedomorfoze) kada je u pitanju skelet ekstremiteta.

Rezultati ove studije su pokazali značajan uticaj morfološke integracije, modularnosti i razvojnih ograničenja u kreiranju fenotipske varijabilnosti u ekstremitetima velikih krestastih mrmoljaka.

Ključne reči: ekstremiteti, veliki krestasti mrmoljci, morfološka integracija i modularnost, sekvencijalna heterohronija, alometrijska heterohronija.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Evolucionarna Morfologija

UDK broj: 591.498:597.5(043.3)
575.21:597.5(043.3)

Limb evolution in crested newts
(*Triturus cristatus* complex, Salamandridae, Caudata)

Summary

Integration, modularity and developmental constraints are three related components of phenotypic variability. Their impacts on morphological evolution on limbs in five species of crested newts were analyzed in this thesis.

Crested newts are valuable model organisms in studies of morphological integration and developmental constraints, especially when concern limbs. They are closely related group of species with known phylogenetic relations, and each characterized by a specific body-to-limb conformation associated with their respective ecologies. Aquatic species of newts have small, elongate bodies and small limbs while more terrestrial species are with large, stocky bodies and robust limbs. Also, as group with complex life cycle, where larval, juvenile and adult stage have different morphologies, ecologies and different diet and locomotor preferences, crested newts have special place in studies of changes in ontogenetic trajectories. Ontogenetic niche change and transition between aquatic and terrestrial environment is connected with process of metamorphosis. Although limbs in newts do not undergo drastic changes in structure during that process, functional demands for high efficient locomotion in both environments are quit different. It is assumed that the differences between species in degree of aquatic and terrestrial locomotion may be the factor which can attribute to changes in length of skeletal elements and different patterns of correlations between limb elements, reflecting adaptations on different environments and life styles of analyzed species of crested newts.

Analysis of morphological integration and modularity has found different aspects of variation patterns in limbs of crested newts. Equivalent ontogenetic

stages of different species of crested newts show higher concordance in the correlation pattern than successive ontogenetic stages within species, with highest level of integration in juvenile stage. High integration in juveniles is function of the rapid, coordinated growth of the limb skeleton during this time period, in which systematic hormones are thought to play a major role. While, low integration in adult stage are probably due to many locally and globally-systematic factors which change effect one to another in time and space, although biphasic life cycle with different locomotion modes have decisive role in ontogenetic changes of morphological integration and modularity. Differences in patterns of integrations between aquatic and more terrestrial species of newts were observed, with lower correlation between homologous limb elements and higher correlation within-limb elements in more terrestrial species, the reverse pattern occurs in more aquatic species.

This study showed important role of developmental constraints in creating phenotypic variability in limbs of crested newts. Comparative analyses revealed some synapomorphic heterochronic shifts specific to crested newts, including delay of the ossification in the second finger and accelerations in metacarpal III and metatarsal V. These shifts involve a change from pre-axial to post-axial dominance in a developmental sequence uncommon to caudate salamanders. No adaptive explanation of these shifts is apparent. Allometric analyses showed two important results: specific growth patterns in *T.dobrogicus* and similar growth pattern after metamorphosis in all species of crested newts. These results are reflecting impact of natural selection as well as internal developmental mechanisms which regulated variation in length of limbs during morphological diversification of crested newts.

All studied species shared the same basipodial pattern, within which the carpus exhibited much more variation than the tarsus. Important point in this study is lost of one carpal element (centrale 1). Specific pattern observed in *T. dobrogicus* is followed with low ossification and loose package of carpale elements.

It is suggested that the uniqueness of *T. dobrogicus* originates from heterochronic process.

Results of this study showed important influence of morphological integration, modularity and developmental constraints in creating phenotypic variability in limbs of crested newts.

Key words: limbs, crested newts, morphological integration and modularity, sequence heterochrony, allometric heterochrony.

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Evolutionary Morphology

UDC number: 591.498:597.5(043.3)
575.21:597.5(043.3)

In evolution, selection may decide the winner of a given game but development non-randomly defines the players (Alberch, 1980).

**Evolucija ekstremiteta velikih mrmoljaka
(*Triturus cristatus* complex, Caudata, Salamandridae)**

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. VARIJABILNOST FENOTIPSKIH KARAKTERISTIKA	2
1.1.1. MORFOLOŠKA INTEGRACIJA I MODULARNOST	3
1.1.2. RAZVOJNA OGRANIČENJA	8
1.1.2.1. HETEROHRONIJA	11
1.2. VELIKI MRMOLJCI KAO MODEL ORGANIZMI	13
1.3. EKSTREMITETI KAO MODEL SISTEM	16
1.3.1. OSNOVNA GRAĐA I VARIJABILNOST EKSTREMITETA	17
1.3.1.1. FILOGENETSKA VARIJABILNOST	18
1.3.1.2. ONTOGENETSKA VARIJABILNOST	19
1.3.1.3. MOLEKULARNI ASPEKTI RAZVIĆA EKSTREMITETA	20
1.4. INTEGRACIJA I MODULARNOST U EKSTREMITETIMA	21
1.5. OGRANIČENJA I EKSTREMITETI	24
1.5.1. BASIPODIALNA VARIJABILNOST	24
1.5.2. HETEROHRONIČNE PROMENE	25
2. CILJEVI STUDIJE	27
3. MATERIJAL I METODE	30
3.1. PREGLED ANALIZIRANIH UZORAKA POPULACIJA MRMOLJAKA	31
3.2. METODE PROSVETLJAVANJA MEKOG TKIVA I DIFERENCIJALNOG BOJENJA KOSTI I PRIKUPLJANJE OSNOVNIH PODATAKA	34
3.3. ANALIZE	36
3.3.1. ODREĐIVANJE DUŽINA ELEMENATA EKSTREMITETA	36
3.3.2. VARIJABILNOST ELEMENATA BASIPODIJUMA I FALANGI PRSTIJU	37
3.3.3. ODREĐIVANJE STEPENA PRISUSTVA KOŠTANOG TKIVA U BASIPODIJUMU	37
3.3.4. MORFOLOŠKA INTEGRACIJA	39
3.3.4.1. PRIPREMA PODATAKA	39

3.3.4.2. MATRICE KORELACIJA, PONOVLJIVOST, KORIGOVANE MATRICE KORELACIJA.....	41
3.3.4.3. INTEGRACIJA.....	42
3.3.4.4. PARCIJALNE KORELACIJE-MODULARNOST.....	43
3.3.4.5. DISPARITET U DUŽINI ELEMENATA EKSTREMITETA.....	44
3.3.5. ALOMETRIJSKI ODNOSI ELEMENATA EKSTREMITETA.....	44
3.3.6. SEKVENCIJALNA HETEROHRONIJA.....	46
3.3.6.1. PGI ANALIZA.....	46
3.3.6.2. RANK ANALIZA-RANGIRANJE DOGAĐAJA PO VARIJABILNOSTI.....	48
4. REZULTATI.....	50
4.1. VARIRANJE BASIPODIJUMA.....	51
4.2. NIVO OSIFIKACIJE.....	54
4.3. MORFOLOŠKA INTEGRACIJA.....	56
4.4. SEKVENCIJALNA HETEROHRONIJA.....	62
4.4.1. PGI ANALIZA.....	62
4.4.2. RANK ANALIZA.....	66
4.5. ALOMETRIJA.....	67
4.5.1. RAST DO METAMORFOZE.....	68
4.5.2. RAST POSLE METAMORFOZE.....	72
5. DISKUSIJA.....	74
5.1. VARIJABILNOST U OBRASCIMA ORGANIZACIJE KARPUSA I TARZUSA.....	75
5.2. MORFOLOŠKA INTEGRACIJA I MODULARNOST.....	77
5.3. HETEROHRONIJA.....	81
5.3.1. SEKVENCIJALNA HETEROHRONIJA.....	81
5.3.2. HETEROHRONIJA RASTA - ALOMETRIJSKA HETEROHRONIJA.....	85
6. ZAKLJUČCI	87
LITERATURA.....	92
BIOGRAFIJA AUTORA	

1. UVOD

VARIJABILNOST FENOTIPSKIH KARAKTERISTIKA

Prema Willmore i sar. (2007), postoji ukupno šest komponenti fenotipske varijabilnosti: kanalisnost, razvojna stabilnost, morfološka integracija, fenotipska plastičnost, heterohronija i heterotopija. Različiti aspekti varijabilnosti fenotipskih karakteristika imaju važan efekat na stopu i smer evolucionih promena. Obrasci varijabilnosti opisuju na koji način razvojni sistem struktura fenotipsko variranje ili utiče na obrsce fenotipske varijabilnosti (Willmore i sar., 2007).

Međuveze veze između razvojne varijabilnosti i evolucione divergence, kao i generalni uticaj razvića na formiranje varijabilnosti, je važno pitanje nove discipline, evolucione biologije razvića (engl. skraćenica *Evo-Devo*) (Gould, 1977; Alberch i sar., 1979; Atchley i Hall, 1991; Hall, 2000, 2012; Müller, 2007; Raff, 2007; Carrol, 2008; Willmore, 2012). Savremena morfologija je osnova evolucione biologije razvića, discipline koja evoluciju analizira iz ugla odlika sistema razvića (Müller, 2007). Zadatak evolucione biologije razvića je da istraži do koje mere razviće „dozvoljava“, limitira ili «pravi greške» u distribuciji varijabilnosti na koju deluje prirodna selekcija.

Programi razvića «određuju» kako će genetička varijabilnost biti prevedena u fenotipsku varijabilnost. Postoje dva osnovna načina na koja razviće utiče na stvaranje varijabilnosti, a relevantno je za evoluciona objašnjenja pomenutih fenomena. Prvi način je nastanak varijanti koje „određuju“ pravac distribucije (strukturnost) stvorene varijabilnosti, a drugi način se odnosi na određivanje nivoa ili intenziteta stvorene varijabilnosti (Hendrikse i sar., 2007).

Integracija, modularnost i razvojna ograničenja su fenomeni kojima se može objasniti variranje vezano za promene u pravcu distribucije varijabilnosti, dok kanalisnost razvića i razvojna stabilnost utiču na intenzitet stvorene varijabilnosti.

Navedeni fenomeni otkrivaju različite ali povezane aspekte varijabilnosti. Pojedinačno i/ili kroz međusobne interakcije oni učestvuju u „prevođenju“ genetičke u fenotipsku varijabilnost (Willmore i sar., 2006). Integracija uslovljena razvojnim ili funkcionalnim odnosima u okviru razvojnog sistema limitira moguće pravce variranja i samim tim moguće realizovane fenotipove. Modularna organizacija razvojnog sistema određuje kovarijacionu strukturu organizma i daje mogućnost stvaranja nove varijabilnosti preko duplikacija ili ponovnog korišćenja modula u različitim razvojnim kontekstima. Ograničenja «prave greške» u stvaranju varijabilnosti postavljajući granice postojećih fenotipova. Ovi fenomeni su neophodni za razumevanje varijabilnosti i samim tim sposobnosti evolucionih promena (engl. *evolvability*) bioloških sistema.

U ovoj studiji sumirani su aspekti variranja ekstremiteta u grupi repatih vodozemaca, sa akcentom na grupu velikih krestastih mrmoljaka, i zatim povezani sa evolucijom ekstremiteta, pri čemu su testirane hipoteze vezane za struktuiranje varijabilnosti u ekstremitetima.

1.1.1.3. MORFOLOŠKA INTEGRACIJA I MODULARNOST

Kao koncept, morfološka integracija datira iz 1958. godine kada su Olson i Miller pretpostavili postojanje međuzavisnosti i povezanosti elemenata u okviru složenih morfoloških celina (Olson i Miller, 1958). Struktura korelacija/kovarijacija, može uticati na pravce evolucionih promena tih osobina (Willmore i sar., 2006, Hallgrímsson i sar., 2007).

Morfološka integracija odražava genetičke, razvojne i funkcijske uticaje (npr. morfološke strukture čije je razviće pod kontrolom istih gena, ili koje učestvuju u istoj funkciji, biće visoko korelisane ili visoko morfološki integrisane). Stepem korelisanosti morfoloških karaktera predstavlja meru njihove integrisanosti (Cheverud, 1996). Integracija je posledica interakcija bioloških procesa koji se nalaze u osnovi nastanka morfološke celine. To se, pre

svega, odnosi na zajedničke nasledne osnove i/ili zajedničke evolucije ovih karaktera, pri čemu veliki uticaj imaju plejotropija gena, neslučajna asocijacija genskih lokusa (engl. *linkage disequilibrium*), kao i selekcija koja utiče na korelaciju osobina. Takođe, integracija odražava zajedničke puteve razvića morfoloških celina, ili se radi o posebnim putevima koji na isti način odgovaraju na neke sredinske faktore (Badyaev i Foresman, 2000, Klingenberg, 2004, Badyaev i sar., 2005). Rezultati nekih istraživanja ukazuju da selekcija u većoj meri uslovljava integraciju morfoloških celina, nego što je to slučaj sa razvićem (Lawler, 2008, Monteiro i Nogueira, 2010).

Hijerarhijski struktuirani obrasci fenotipskih korelacija su česti kod višecelulskih životinja (Olson i Miller, 1958; Van Valen, 1965b). Nivo fenotipskog kovariranja zavisi od izbora morfološke strukture. Promene vezane sa veličinom tela stvaraju osnovni nivo kovariranja. Sledeći nivo kovariranja nastaje usled promena oblika koje su praćene promenom u veličini tela, a koje su često od funkcionalnog i razvojnog značaja. Prema ovome, selekcija za vezu između veličine i oblika, stvara alometrijsko kovariranje i pretpostavljenu vezu između veličine i oblika neke morfološke celine ili organizma. Najzad, kovariranje može da prevaziđe nivo očekivan samo na osnovu veličine ili alometrijskih odnosa. Taj nivo kovariranja može biti selektovan zbog funkcionalnih odnosa između struktura. Visoko kovariranje može se takođe ostvariti zbog zajedničkih razvojnih veza ili prostorne povezanosti struktura.

Morfološka integracija se odnosi na struktuiranost morfološke varijabilnosti nastale kao rezultat razvojne, genetičke i funkcionalne povezanosti morfoloških karaktera (Olson i Miller, 1958; Cheverud, 1996; Wagner, 1996). Moguće je razlikovati tri međusobno povezana oblika morfološke integracije: razvojno/funkcionalna, genetička i evolucionarna integracija (Cheverud, 1996). Pod razvojno/funkcionalnom integracijom se podrazumeva povezanost morfoloških celina ili njihovih pojedinih delova na osnovu zajedničkog razvojnog procesa ili iste specifične funkcije. Osobine koje su razvojno povezane, tj. osobine čije se razviće odvija po istim ili sličnim

razvojnim putanjama, biće u većoj meri morfološki integrisane od razvojno nepovezanih osobina, tj. osobina čije razviće teče odvojeno. Funkcionalna integracija podrazumeva interakciju morfoloških celina koje objedinjuje ista specifična funkcija, dok se genetička integracija odnosi na zajedničko nasleđivanje osobina usled vezanog nasleđivanja i plejotropije. Evoluciona integracija se može definisati kao koordinisana evolucija morfoloških celina u okviru istih funkcionalnih kompleksa. Prema kvantitativno-genetičkoj teoriji, razvojno i funkcijski povezane osobine visoko su korelisane i zajedno evoluiraju (Lande i Arnold, 1983). Razvojno i funkcijski povezane osobine odlikuje koordinisana selekcija i zajedničko nasleđivanje, za razliku od razvojno i funkcijski nezavisnih osobina koje ostaju relativno nekorelisane. Fenotipske korelacije predstavljaju dobru aproksimaciju genetičkih korelacija (Cheverud, 1984, 1988) i ustanovljen je visok stepen sličnosti između strukture razvojne i funkcijske integracije i strukture fenotipskih i genetičkih korelacija (Cheverud, 1996).

Koncept modularnosti je blisko povezan sa konceptom integracije. Modul predstavlja relativno autonoman entitet sa višim stepenom unutrašnje integracije u odnosu na povezanost sa drugim entitetima (modulima) istog sistema (Cheverud, 1996; Raff, 1996; Wagner, 1996; Bolker, 2000; Klingenberg, 2004, 2005, 2008; Ivanović i Kalezić, 2013).

Kao što je Wagner (1995, 1996) pokazao, moduli se mogu posmatrati kao delovi organizma sačinjeni od osobina koje kovariraju zbog genetičke plejotropije i razvojnih interakcija. Ovaj tip modularnosti, koji su Wagner i Mezey (2003) nazvali varijacionom modularnošću, predstavlja savremeni konceptualni okvir za razumevanje integracije u morfološkim strukturama. Kovariranje struktura je „neophodno“ kod složenih organizama zbog potrebe za zadržavanjem primerenog odnosa veličine i oblika struktura tokom ontogenije i ukupnog opsega fenotipske varijabilnosti. Kovarijaciona struktura nastaje kada genetički i sredinski izvori variranja utiču različito na postojeće morfološke strukture. Ukoliko su sve strukture podjednako obuhvaćene, tada

integracija postoji ali nije strukturirana. Ovo se može desiti kad veličina i izometrijski rast predstavljaju jedine uzroke variranja. Sa druge strane, ukoliko je variranje morfološke strukture po tipu slučajnosti tada nema integracije. Kovarijaciona struktura oslikava organizaciju organizama u setove struktura ili osobina koje imaju zajednički razvojni ili genetički uticaj pa se može reći da je kovarijaciona struktura određena varijacionom modularnošću organizma. Smatra se da je modularna organizacija bioloških entiteta osnova pojave složenih adaptacija, time što relativna nezavisnost modula omogućava da moduli, evoluiraju različitim brzinama i u različitim pravcima (Ivanović i Kalezić, 2013). Prisustvo varijacionih modula omogućava, sa jedne strane, da mutacija koja poboljšava funkciju jednog modula nema negativan plejotropni efekat na druge module jedne biološke celine, i sa druge strane, omogućava evoluciju na različitim nivoima biološke organizacije, a da pri tome ne dođe do narušavanja integracije viših nivoa organizacije (Klingenberg, 2005; Müller, 2007). Poznat primer je pentadaktilni ekstremitet kopnenih kičmenjaka, u okviru koga su relativno česte evolucione promene pri čemu se zadržava njegov osnovni morfotip (Kemp, 2007).

Modularna organizacija je prisutna na svim nivoima biološke organizacije pri čemu pripadnost jednom modulu ne isključuje učešće i u nekom drugom modulu. Takođe, postoji više kriterijuma određenja modula u evolucionoj morfologiji, pri čemu nijedan od kriterijuma ne karakteriše modul u potpunosti tako da ne postoje opšte prihvaćene definicije modula (Bolker, 2000; Winther, 2001; Eble, 2005; Rieppel, 2005; Ivanović i Kalezić, 2013). Neki od mogućih kriterijuma modula su sledeći: specifična genetička osnova, konzervativizam na nivou individualnog razvića, stepen međusobne povezanosti elemenata modula, specifičnost modula u pogledu njihovih promena tokom ontogenije i filogenije grupa.

Integracija i modularnost povezuju razviće i evoluciju na dva osnovna načina. Prvi se odnosi na veze između osobina i njihovih zajedničkih razvojnih uticaja (Cheverud, 1982; Wagner, 1996). Međutim, kod složenih struktura veliki

broj razvojnih procesa utiče na kreiranje krajnje kovarijacione strukture (Cooper i sar., 2007). Na taj način je fenotipska varijabilnost (koja je prisutna za delovanje prirodne selekcije) strukturirana varijabilnošću razvojnih procesa. Ovi procesi produkuju ose kovariranja koje rezultuju u linijama najmanjeg otpora (engl. *lines of least resistance*), duž kojih grupa karaktera/osobina može varirati koordinisano (Olson i Miller, 1958; Klingenberg, 2010a). Međutim, kumulativno delovanje procesa razvića može da dovede do promena obrazaca kovarijacionih odnosa karaktera, pa se obrasci modularnosti i integracije na različitim ontogenetskim stupnjevima ne moraju podudarati. Pošto ne postoji direktna relacija između genetičkih, razvojnih i funkcijskih modula, obrasci modularnosti i integracije na adultnom stupnju predstavljaju sumu svih prethodnih procesa („*palimpsest*“) čiji su se uticaji na kovarijacionu strukturu preklapali, brisali, ponovo uspostavljali i time menjali jedan drugom efekat (Hallgrímsson i sar., 2009).

Drugi način na koji integracija i modularnost povezuju razviće i evoluciju predstavio je Čeverud koji je u seriji radova (Cheverud, 1982, 1984, 1996) došao do generalne teze da preko selekcije koja deluje na genetičke i razvojne karakteristike plejotropije funkcionalna integracija vodi ka genetičkoj integraciji što sa druge strane vodi do razvojne integracije. Tačnije, selekcija favorizuje pojavu razvojne arhitekture u kojoj funkcionalno povezane osobine reaguju na koordinisan način. Čeverudova centralna teza predviđa da će selekcija favorizovati razvojne procese koji produkuju ujednačeno variranje između funkcionalno povezanih osobina. Može se pretpostaviti da vrste koje koriste oba seta ekstremiteta za kursorijsko kretanje imaju veće kovariranje između homologih elemenata u prednjim i zadnjim ekstremitetima, nego vrste kod kojih su ekstremiteti izmenjeni zbog funkcije. Kao što su pokazali Young i Hallgrímsson (2005), ova pretpostavka je tačna kod sisara.

Morfološka integracija, koja utiče na pravac, ali ne i na nivo fenotipske varijabilnosti, može se posmatrati kao faktor koji ograničava ili kao faktor koji omogućava evoluciju morfoloških struktura (Pigliucci, 2003; Porto i sar., 2009;

Klingenberg, 2010a). Tako je eksperimentalno utvrđena veza između promena na morfološkom nivou pod uticajem stresa i stepena integracije; veće promene su karakteristične za module sa nižim stepenom integracije i obrnuto, module sa višim nivoom funkcijske i morfološke integracije odlikuju manje morfološke promene (Badyaev i Foresman, 2000). Međutim, u nekim drugim slučajevima morfološka integracija može da omogući evolucionu promenu morfoloških celina time što će povećati nivo adaptacija na uslove životne sredine, ili će povećati nivo integrisanosti procesa razvića (Badyaev i Foresman, 2000).

Smatra se da modularna organizacija bioloških sistema povećava njihov evolucionu potencijal tj. sposobnost za evolucionu promenu (Wagner i Altenberg, 1996). Istraživanja na lobanji karnivora i primata su pokazala da integracija karaktera unutar modula utiče na smanjenje varijabilnosti tih karaktera i time sposobnosti njihove evolucije (Goswami i Polly, 2010). S druge strane, pokazano je da su promene u okviru dva modula skeletnog sistema (lobanja i vratni deo kičmenice naspram ostalog dela skeleta) tokom evolucije pterodaktila, omogućila adaptivnu radijaciju ove grupe (Lü i sar., 2010). Po navodima Carroll (2001), modularnost je omogućila izrazitu morfološku složenost i evolucionu diverzifikaciju višćelijskih životinja.

1.1.1.3. RAZVOJNA OGRANIČENJA

Za većinu savremenih evolucionih biologa, najprihvatljivija definicija ontogenetskih ograničenja jeste sklonost, ka stvaranju nekih varijanti fenotipova ili postavljanje granica fenotipskoj varijabilnosti, koje uzrokuju struktura, karakter, kompozicija ili dinamika sistema razvića (Alberch, 1982; Maynard-Smith, 1985). Uspostavljeni sistemi razvića, mogu ograničavati smer i opseg evolucionih promena, na duže ili kraće staze. Neka ograničenja su fizička predstavljajući nemoguće geometrije tj. oblike, dok su druga ograničenja funkcionalna. Ova ograničenja daju objašnjenja zašto neke morfološke celine, a ne neke druge, postoje u evoluciji neke grupe.

Postoji nekoliko linija dokaza koji ukazuju na postojanje razvojnih ograničenja (Schwenk, 1995): različita brzina evolucije karaktera u određenoj filogenetskoj liniji (fenomen koji je poznat kao mozaička evolucija), limitirani opseg fenotipova koji postoje u prirodi (fenomen koji se može označiti i kao nepotpuno popunjavanje morfološkog prostora (Alberch, 1982)), razlike koje postoje poređenjem postojećih fenotipova sa teorijski optimalnim fenotipom (Schwenk, 1995), tendencija ka limitiranom broju promena kada se embrioni tretiraju sa teratogenima ili su predmet genetskih manipulacija (Alberch, 1989). U svim navedenim slučajevima postoji razlika između opaženih frekvencija karaktera i očekivanih vrednosti što ukazuje na specifičnu ulogu razvojnog sistema u kreiranju prisutne varijabilnosti (Richardson i Chipman, 2003).

Tradicionalna podela ontogenetskih ograničenja procesa evolucije zasniva se na tri kategorije - fizička, morfogenetska i filogenetska ograničenja. Fizička ili mehanička ograničenja podrazumevaju da odnosi mehanike, hidraulike, difuzije i fizičke potpore između različitih telesnih delova i funkcija zavise od fizičkih zakona. Morfogenetska ograničenja zasnivaju se na pravilima morfogenetske konstrukcije tj. načinima na koje se reguliše diferencijacija ćelija i tkiva, odnosno razviće pojedinih delova tela. Zahvaljujući ovim pravilima, neki putevi modifikacije fenotipova postaju znatno manje verovatni od drugih. Na primer, iako su se ekstremiteti kičmenjaka menjali na različite načine tokom 300 miliona godina evolucije, neki pravci promena nikada nisu uočeni, recimo, srednji prst nikada nije kraći od ostalih prstiju. Filogenetska ograničenja predstavljaju rezultat evolucije gena koji su direktno odgovorni za konstrukciju određene fenotipske forme ili telesnog sklopa. Ovde se pre svega misli na Hox gene koji imaju centralnu ulogu u razviću tj., u aktivaciji, usmeravanju, određivanju mesta odigravanja razvojnih procesa i telesnih osa. Jedan od zanimljivih primera filogenetskog ograničenja je smanjena varijabilnost u ekstremitetima kod marsupialnih sisara. Iako se placentalni sisari odlikuju velikom raznovrsnošću u formi ekstremiteta (ekstremiteti sa kandžama, ekstremiteti modifikovani u krila, ekstremiteti u obliku vesla, peraja,

ekstremiteti čoveka), kod marsupialnih sisara ekstremiteti izgledaju međusobno slično. Sears (2004) je utvrdila da je neophodnost fetusa da dopuzi do majčine torbe dovela do ograničenja u razvoju ekstremiteta koji podrazumeva brzi razvoj miškulature i hrskavice ekstremiteta. Takođe, pošto geni dobijaju nove uloge tokom evolucije, oni mogu biti aktivni u više različitih modula, čineći promenu složenijom. Galis (1999) i Galis i Metz (2001) u različitim studijama su dali objašnjenje postojanja samo sedam vratnih pršljenja kod sisara. Po njima, uspostavljanje veze Hox gena, koji su specifični za ove pršljenove, sa proliferacijom stem ćelija, je dovelo do prisutnog ograničenja u broju pršljenja (promena u ekspresiji Hox gena bi mogla da dovede do promene u regulaciji proliferacije stem ćelija).

Ograničenja se ne mogu razmatrati samo u negativnom kontekstu, kao limitirajući faktori fenotipskog variranja, već mogu omogućiti nastanak evolucionih novina. Te specifične fenotipske promene određuje modifikacija sistema razvića, preko efekta praga (engl. *threshold effect*) koji se ispoljava posle akumulacije dovoljnog broja malih promena, koje su se kontinuirano odigravale tokom razvića u dovoljno dugim vremenskim intervalima (Muller i Newman, 2005). Poznati primeri su evolucija/pojava direktnog razvića u mnogim grupama (Raff, 1992; Hanken i sar., 1997), u kojima je došlo do razbijanja (disocijacije) osnovnih ograničenja tokom ranog razvića. Uspostavljanje novih transformacija i u razvojno ograničenom sistemu, može stvoriti nove adaptivne prostore i omogućiti adaptivnu radijaciju koja nije bila moguća ranije (Muller i Wagner, 1991). Morfološke novine ne nastaju slučajno već su obično povezane sa nekom sredinskom promenom ili heterogenim ekološkim uslovima. Tako je nastanak najvećeg broja grupa marinskih beskičmenjaka povezan sa promenama nivoa vode, tj. blizinom ili udaljavanjem od obale (Jablonski, 2005). Takođe, pojave kao što su hiperfalangija kod grupe Cetacea ili transformacija krljušti reptila u pera (Prum, 1999), predstavljaju novine koje su omogućile brzu radijaciju datih grupa u prethodno nepopunjene ekološke niše. Tako se razvojna ograničenja ne mogu samo posmatrati u kontekstu limitiranja

varijabilnosti morfoloških formi u prirodi, već i kao važan faktor u stvaranju novina (Hall, 1996; Wagner i Muller, 2002; Richardson i Chipman, 2003).

1.1.2.1. HETEROHRONIJA

Heterohronija je često analizirana kao primer razvojnih ograničenja, i uključuje promene u vremenu i brzini procesa razvića karakteristika potomaka u odnosu na pretke. Može se dogoditi na bilo kom nivou biološke organizacije, uključujući i molekulske i ćelijske nivoe, kao i na bilo kom stupnju ontogenetskog razvića. Izduženi prsti u ekstremitetima delfina su rezultat heterohronične promene u ekspresiji *Fgf8*, važnog parakrinog faktora u razvoju ekstremiteta (Richardson i Oelschlager, 2002). Takođe, kod vrste guštera roda *Hemiergis* koji uključuje vrste sa tri, četiri i pet prstiju, broj prstiju je regulisan dužinom vremena aktivnosti gena *Shh* - Sonic hedgehog u zoni polarizovane aktivnosti u začetku ekstremiteta. Kraća dužina *Shh* ekspresije je povezana sa manjim brojem prstiju (Shapiro i sar., 2003). Heterohronične promene mogu postojati i na intraspecijskom nivou (u slučaju polifenizma ili fenotipske plastičnosti, Reilly i sar., 1997, Richardson i sar., 2009) ili čak na individualnom nivou, kada dolazi do promena u vremenu i brzini formiranja serijski homologih morfoloških celina (Richardson i sar., 2009).

Termin heterohronija potiče od poznatog biologa 19. veka Ernsta Hekela koji je ovim terminom označio odstupanja od rekapitulacije (Russell, 1916). Heterohronija počinje da dobija naznake moderne definicije u radu Gavin Rylands de Beer (1958), koji je odbacio koncept rekapitulacije i filogenije kao jedini fokus komparativne biologije razvića. Takođe, on je demonstrirao da važne evolucione novine mogu ali i ne moraju biti prisutne kod adultnih jedinki, a da se heterohronične promene mogu desiti na bilo kom stupnju ontogenije (Smith, 2002). Ipak, savremen pogled na odnos razvića i evolucije postavili su Gould (1977) i Alberch i sar. (1979), koji su koncept heterohronije uvrstili u jednu od modernih paradigmi današnje evolucione biologije.

Heterohronija se smatra važnim evolucionim mehanizmom koji dovodi do morfoloških promena, kod svih grupa životinja i na različitim stupnjevima razvića. Studije vezane za heterohronične promene su se do skoro bazirale samo na razlikama u relativnim stopama rasta određenih morfoloških struktura (McKinney, 1988). Ove promene se označavaju kao heterohronija rasta (*engl. growth heterochrony*) (Smith, 2001), i pored promena u stopi rasta, uključuju i promene u vremenu početka i kraja diferencijacije morfoloških struktura. U poslednje vreme heterohronija se vezuje za promene u relativnom vremenu pojave određenih događaja (sekvenci) u razviću potomačke grupe u odnosu na predačku grupu (Richardson, 1995; Smith, 2001). Treća vrsta heterohroničnih promena obuhvata promene vremena ekspresije gena. Kraće vreme ekspresije gena *Sonic hedgehog* (SHH), koji kodira intracelularne signalne molekule (*Sonic hedgehog* (Shh)), dovodi do smanjenja broja prstiju ekstremiteta kod filogenetski bliskih vrsta guštera australijskog roda *Hemiergus* spp. (Shapiro i sar., 2003).

Komparativne analize promena tokom ontogenije su od posebne važnosti za razumevanje evolucionih mehanizama promena fenotipa putem heterohroničnih promena, kao i uticaj ontogenetskih ograničenja (Webster i Zelditch, 2005, Piras i sar., 2011). Ontogenetske promene tokom individualnog razvića jedinki, predstavljaju kontinuiran sled morfoloških transformacija, čije faze ne slede samo jedna drugu u prostoru i vremenu, već je za pojavu naredne faze neophodno odigravanje prethodne faze (usmerenost i konzervativnost ontogenije) (Ivanović i Kalezić, 2013). Morfološke promene tokom individualnog razvića mogu se grafički prikazati ontogenetskim putanjama (Alberch i sar., 1979). Putanje su definisane osnovnim parametrima morfoloških struktura: vremenom diferencijacije (inicijacija i terminacija), veličinom i oblikom. Promene veličine i oblika morfoloških struktura najčešće su uslovljene njihovim alometrijskim odnosima, dok promene u vremenu diferencijacije mogu biti vezane za promene u početku diferencijacije (inicijacija) i završetku diferencijacije (terminacija).

Do heterohroničnih promena može doći promenama u vremenu diferencijacije (ranijom ili kasnijom inicijacijom i terminacijom), kao i povećanjem ili smanjenjem stope rasta. Na taj se način ontogenetske putanje mogu skraćivati ili produžavati, mogu promeniti pravac, ili menjati svoj položaj, zadržavajući isti pravac - lateralna transpozicija ontogenetske putanje. Promena pravca potomačke u odnosu na predačku ontogenetsku putanju ukazuje na promene dinamike razvića morfološke strukture drugačijim stopama rasta, ili na promene položaja koje su posledice promena kontrolnih parametara tokom ranih faza razvića. Isti pravac ontogenetskih putanja, ukazuje na zadržavanje predačke ontogenetske putanje morfoloških celina (Klingenberg, 1998).

Različita istraživanja su pokazala da su promene u dužini putanja, kao i lateralne transpozicije putanja, češće nego promene pravca ontogenetskih putanja. Ontogenetske putanje su u izvesnoj meri elastične, tako da u nekim slučajevima, i pored promena različitih parametara, ne mora doći do promene fenotipa. Razlog je postojanje povratnih sprega između kontrolnih parametara ontogenetskih putanja. Takođe, često nije lako odvojiti pojedinačni efekat promene u kontrolnim parametrima ontogenetskih putanja. Male promene u kontrolnim parametrima tokom početnih faza razvića mogu da dovedu do znatnog menjanja morfoloških celina .

1.2. VELIKI MRMOLJCI KAO MODEL ORGANIZMI

Veliki krestasti mrmoljci predstavljaju važne model organizme za istraživanja u oblasti morfološke integracije i razvojnih ograničenja, posebno ako se anliziraju ekstremiteti. Sa jedne strane to je grupa blisko srodnih vrsta sa poznatim filogenetskim odnosima, koje imaju različite preference prema akvatičnoj/terestričnoj sredini; tačnije, neke vrste su više akvatične sa izduženim telom i kratkim nogama, dok su druge vrste više terestrične sa snažnim telom i dugim nogama. Takođe, kao grupa sa složenim životnim ciklusom koji podrazumeva postojanje akvatične larve koja procesima

metamorfoze postaje terestrična juvenilna jedinka, što kada su ekstremiteti u pitanju, otvara pitanje različitih odnosa, uticaja i ograničenja sredinskih faktora i ontogenetskih putanja tokom razvića.

Veliki mrmoljci pripadaju grupi evropskih mrmoljaka. U taksonomskom pogledu, ova monofiletska grupa određuje se kao nadvrsta (Artenkreis) *Triturus cristatus* superspecies (Arntzen i sar., 2007). Grupu velikih krestastih mrmoljaka čine pet vrsta roda *Triturus* sa parapatričkom distribucijom i hibridizacijom u zonama kontakta (Espregueira Themudo i sar., 2009):

- *T. cristatus* (Laurenti 1768) - običan veliki mrmoljak,
- *T. dobrogicus* (Kiritzescu 1903) - podunavski veliki mrmoljak,
- *T. karelinii* (Strauch 1870) - dugonogi veliki mrmoljak
- *T. carnifex* (Laurenti 1768) - zapadni glavati mrmoljak,
- *T. macedonicus* (Karaman 1922) - istočni glavati mrmoljak.

Pretpostavka je 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 vrsta *T. karelinii* nalazi 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; Wielstra i Arntzen, 2011). 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).

Areal grupe *Triturus cristatus* superspecies obuhvata veći deo Evrope, izuzev jugozapadnog dela Francuske, Iberijskog poluostrva, Irske, južne Grčke i ostrva Mediteranskog mora. Na severu, areal se pruža do Skandinavije i Škotske, a na istoku do Kavkaza i centralne Azije. Balkansko poluostrvo je, ne samo centar nastanka ove grupe, već i jedini prostor preklapanja areala (posebno teritorija Srbije, Džukić, 1993; Crnobrnja-Isailović i sar., 1997; Kalezić i

sar., 1997; Arntzen i sar., 2007; Ivanović i Kalezić, 2013). Na Balkanskom poluostrvu se susište areali četiri vrste (*T. cristatus*, *T. dobrogicus*, *T. karelinii* i *T. macedonicus*). U zonama prostornog kontakta dolazi do ograničene hibridizacije i introgresija (Wallis i Arntzen, 1989). Po svojoj prilici, ove vrste su nastale skoro istovremeno, što se može zaključiti na osnovu politomije filogenetskog stabla dobijenog na osnovu molekularnih (Arntzen i sar., 2007; Ivanović i sar., 2008a; Espregueira Themudo i sar., 2009; Wielstra i sar., 2010) i morfoloških podataka (Vukov, 2009). Istovremeni nastanak vrsta pruža veliku pogodnost istraživačima prilikom utvrđivanja stopa evolucionih promena različitih karaktera genotipa i fenotipa pošto je vreme trajanja evolucije približno isto kod svih vrsta.

Veliki mrmoljci se odlikuju složenim životnim ciklusom (Griffiths, 1996). Uglavnom su vezani za šumske ekosisteme, i to uglavnom listopadne, sa stajaćim, ili sporotekućim vodama obrasle vodenom vegetacijom. Leto i zimu provode na kopnu na vlažnim i senovitim mestima. Parenje se odigrava u proleće, najčešće u manjim, stajaćim vodama (Džukić, 1993), gde nakon složene svadbene igre, mužjaci polažu spermatofore koje ženke prihvataju i unose u kloaku. Ženke polažu u proseku oko 200 jaja lepeći ih na submerznu vegetaciju. Embrionsko razviće traje dve do tri nedelje. Ovaj period je kritičan u razviću zbog prisustva balansnog letalnog sistema na prvom paru hromozoma što dovodi do smrtnosti oko 50% od ukupnog broja formiranih embriona (homozigotni za prvi par hromozoma) (Wallace, 1994). Dužina larvenog perioda traje nekoliko meseci, obično do druge polovine leta. Larve metamorfoziraju i juvenilne jedinke koje pri kraju jeseni napuštaju vodu najčešće prezimljavaju na kopnu. Polnu zrelost obično dostižu između druge i četvrte godine života, dok je prosečna starost adultnih jedinki od šest do deset godina (Miaud i sar., 1993, Kalezić i Đorović, 1998, Olgun i sar., 2005). Veliki mrmoljci su najveći pripadnici evropskih mrmoljaka (prosečna dužina tela ženki oko 15 cm, i mužjaka oko 12 cm). Odlikuju se prisustvom polnog dimorfizma u veličini tela (Ivanović i sar., 2008c), kao i prisustvom više

sekundarnih seksualnih karakteristika kod mužjaka u vreme parenja (kožni nabor i plavičaste pruge na bočnim stranama repa).

Ono što velike krestaste mrmoljke čini interesantnim model organizmima u evolucionim istraživanjima je i sličan obrazac variranja čitavog niza fenotipskih karakteristika: variranje u obliku i veličini tela (Arntzen i Wallis, 1999; Wielstra i Arntzen, 2011, Vukov i sar., 2011), broju pršljena (Crnobrnja-Isailović i sar., 1997; Arntzen i Wallis, 1999, Lanza i sar., 2010), obliku lobanje (Ivanović i sar., 2007, 2008a), skeletu ekstremiteta (Ivanović i sar., 2008b), i veličini mozga (Vukov i sar., 2007), kao i u karakteristikama jaja, odlikama životne istorije, razvića i ontogenetskim promenama u obliku na larvenom stupnju (Furtula i sar., 2008, Cvijanović i sar., 2009, Ivanović i sar., 2011). Ovo variranje ima specifičnu pravilnost koja se odražava klinalnom distribucijom, sa vrstom *T. dobrogicus* na jednom kraju, vrstom *T. cristatus* sa središnjim položajem i vrstama *T. carnifex* i *T. macedonicus*, i *T. karelinii*, na drugom kraju kline. Opisani obrasci fenotipskog variranja u velikoj meri prate, za vrste specifične ekološke faktore, pre svega odnos dužine akvatične i terestrične faze godišnjeg ciklusa. Najakvatičnija vrsta je *T. dobrogicus* sa periodom od šest meseci u vodenom staništu, slede vrste, *T. cristatus* sa periodom od pet meseci, *T. macedonicus* i *T. carnifex* sa četiri meseca i *T. karelinii* sa svega tri meseca godišnje (Wielstra i Arntzen, 2011). Takođe, postoji izražena korelacija između ekologije vrste i oblika/forme tela. Najakvatičnija vrsta, *T. dobrogicus*, ima izduženo telo i male ekstremitete pogodne za kretanje u vodenoj sredini, dok zdepasto telo vrsta *T. karelinii*, *T. macedonicus* i *T. carnifex*, sa dugim i dobro razvijenim ekstremitetima, više odgovara lokomociji na kopnu.

1.3. EKSTREMITETI KAO MODEL SISTEM

Ekstremiteti repatih vodozemaca (Caudata) služe kao «prirodna laboratorija» za probleme morfološke evolucije (Shubin i Wake, 2003) i koriste se kao model sistem u različitim evolucionim i razvojnim studijama (Hanken,

1983; Vogl i Rienesl, 1991; Rienesl i Wagner, 1992; Shubin i Wake, 1996; Shubin, 2002; Gvozdik i van Damme, 2006).

1.3.1.3. OSNOVNA GRAĐA I VARIJABILNOST EKSTREMITETA

Parni ekstremiteti tetrapoda imaju zajednički osnovni plan građe i čine ih tri skeletna segmenta: 1. stylopodium (humerus u prednjim, femur u zadnjim ekstremitetima), 2. zeugopodijum (ulna i radius u prednjim ekstremitetima, tibia i fibula u zadnjim ekstremitetima) i 3. autopodium (nastaje iz tri zone kondenzacije: preaksijalne zone (radiale/tibiale, element y), centralne zone (intermedium, centrale, ulnare/fibulare) i digitalnog luka (bazalni element (*engl., basal commune*), distalni karpalni i tarzalni elementi, falange prstiju).

Repati vodozemci igraju centralnu ulogu u diskusijama o evoluciji ekstremiteta tetrapoda zbog razvića koje je kod ove grupe drugačije u odnosu na ostale tetrapode, bezrepe vodozemce, i amniote. Razlike se odnose na način na koji se formiraju skeletni elementi (*engl. patterning of skeletal elements*) putem procesa rane kondenzacije i hondrifikacije mezenhimskih ćelija koje zatim daju individualne segmente ekstremiteta. Posle kondenzacije elemenata stilopodiuma (humerus/femur), nastaje kondenzacija oblika slova Y od koje nastaju elementi zeugopodijuma, ali za razliku od ostalih tetrapoda, kod repatih vodozemaca preaksijalni elementi (radius/tibia) uvek prednjače u razvoju u odnosu na razvoj postaksijalno položenih elemenata (ulna/fibula).

Sledeća razlika je razviće distalno položenog mesopodijalnog elementa kao nezavisne kondenzacije pre nastanka proksimalnih elementa. Ovo je povezano sa ranom pojavom bazalnog skeletnog elementa (*engl. basale commune*) i spajanjem distalnog karpalnog / tarznog elementa 1 i 2, poznate samo kod grupe repatih vodozemaca (Caudata) (Shubin i Wake, 2003) i fosilnog roda *Gerobatrachus* (*Amphibamidae*) ranog Perma (Anderson i sar., 2008).

Ostali karpalni/tarzalni elementi se formiraju od više proksimalno raspoređenog mezenhimalnog produženja, dok formiranje digitalnog luka ide u

postaksijalnom pravcu sa rasporedom u nastanku prstiju: II-I-III-IV(-V). Suprotno od ostalih tetrapoda, repati vodozemci pokazuju specifičnu ili posebnu preaksijalnu dominantnost u obrascu skeletogeneze ekstremiteta. Takođe, ova obrnuta polarnost nije samo prisutna tokom razvića ekstremiteta, već je izražena i u razvojno/evolucionom gubitku prstiju kod nekih vrsta repatih vodozemaca (Alberch i Gale, 1983; Stopper i Wagner, 2007).

Brojne odlike razvića ekstremiteta repatih vodozemaca su stabilne i mogu se uočiti kod svih repatih vodozemaca. Te odlike uključuju ranije razviće elemenata radius/tibia u odnosu na odgovarajuće postaksijane zeugopodijalne elemente, rano formiranje bazalnog elementa u prednjim i zadnjim ekstremitetima, kao i smer diferenciranja prstiju od preaksijalnih (prvi i drugi prst) ka postaksijalnim prstima (treći, četvrti i peti prst) (Shubin i Alberch, 1986; Shubin i Wake, 2003). Generalno, danas je prihvaćena hipoteza o evoluciji preaksijalne dominacije u razviću ekstremiteta repatih vodozemaca, vezana za njen nastanak kao larvene adaptacije, olakšavajući interakciju slobodno plivajuće larve i spoljašnje sredine, dok se u isto vreme ekstremiteti koriste za kretanje i uporedo teče njihov razvoj (Schmalhausen, 1910; Vorobyeva i Hinchliffe, 1996; Shubin i Wake, 2003).

Drugi aspekti razvića ekstremiteta kod repatih vodozemaca su mnogo varijabilniji. Varijabilnost u okviru ove grupe prevazilazi utvrđenu varijabilnost bilo koje grupe tetrapoda (Shubin i Alberch, 1986; Blanco i Alberch, 1992; Vorobyeva i Hinchliffe, 1996; Shubin i Wake, 2003; Franssen i sar., 2005; Frobisch, 2008).

1.3.1.3. FILOGENETSKA VARIJABILNOST

Evolucija ekstremiteta repatih vodozemaca je išla u pravcu redukcije kako u broju mesopodialnih elemenata, tako i u broju prstiju. Bazalne grupe (kao što su *Hynobiidae* i *Cryptobranchidae*) se odlikuju većim brojem koštanih elemenata, kao i velikom interspecifičnom i intraspecifičnom varijabilnošću (sa

prisustvom pleziomorfnih elemenata koji su izgubljeni u standardnim aranžmanima drugih repatih vodozemaca (kao što su: *postminimus*, *prepollex*, *prehallux*). Novine u dizajnu ekstremiteta retko uključuju nastanak novih elemenata, već su češće promene u broju, obrascu ili organizaciji postojećih hrskavičavih kondenzacija (od lokalne redukcije karpalnih/tarzalnih elemenata do gubitka elemenata ekstremiteta ili celog ekstremiteta, kao što je slučaj sa familijama kod kojih se sreće redukcija različitog stepena: *Sirenidae*, *Proteidae*, *Amphiumidae*). U okviru familije *Salamandridae* postoji varijabilnost osnovnog obrasca građe ekstremiteta. U prednjim ekstremitetima najčešće odstupanje od standardnog obrasca je fuzija/spajanje kostiju ulnare i intermedium (kod vrsta rodova *Taricha* i *Triturus* (Rienesl i Wagner, 1992; Zaffaroni i sar., 1992; Shubin i sar., 1995). U zadnjim ekstremitetima se najvažnije variranje odnosi na gubitak petog prsta kod vrste *Salamandrina terdigitata*, kao i fuzija distalnih tarzalnih elemenata 4 i 5, kod vrsta rodova *Cynops*, *Euproctus* i *Triturus*. Broj falangi u prstima je 1-2-3-2 i 1-2-3-3-2.

1.3.1.3. ONTOGENETSKA VARIJABILNOST

Osnovni izvor ontogenetske raznovrsnosti ekstremiteta su razlike u vremenu pojave ekstremiteta i prstiju, koji variraju između različitih vrsta u zavisnosti od reproduktivne ekologije, tačnije ekologije larvene faze. Repati vodozemci sa larvom koja se razvija u barama pokazuju izraženu razliku u vremenu pojave prednjih u odnosu na zadnje ekstremitete, sa prednjim koji se razvijaju danima pre pojave zadnjih ekstremiteta. Kašnjenje je manje izraženo kod vrsta čije se larve razvijaju u brzacima, a još manje kod grupa koje imaju direktno razviće (Blanco i Alberch, 1992; Wake i Shubin, 1998; Vorobyeva, 2009; Shubin i Wake, 2003). Razlike u vremenu pojave prednjih u odnosu na zadnje ekstremitete su poznate kod mnogih grupa tetrapoda (Bininda-Emonds i sar., 2007), ali su posebno iztražene kod grupe repatih vodozemaca. Dužina vremenskog perioda između pojave začetaka prednjih i zadnjih ekstremiteta je

veoma različita u grupi repatih vodozemaca, pa je vreme kod vrste *Pleurodeles waltl* (Gallien i Durocher, 1957) oko 20 dana, a kod vrsta familije *Pletodontoidae* sa direktnim razvićem, samo 1 do 4 dana.

Izraženo variranje u vremenu diferencijacije prstiju je takođe karakteristično za ovu grupu. Umesto istovremenog nastanka prstiju sa specifičnom fazom u obliku vesla, kroz koju prolaze pri nastanku prsti bezrepih vodozemaca i amniota, prsti repatih vodozemaca, sa slobodno plivajućim larvama, nastaju svaki zasebno sa razvojem koji teče uporedo sa njihovim korišćenjem, dok larva pliva u interakciji sa sredinom koja je okružuje. Razviće drugog i prvog prsta je značajno ubrzano u poređenju sa ostalim prstima. Redosled formiranja prstiju kod repatih vodozemaca sa direktnim razvićem je sličnije amniotama i bezrepih vodozemcima i to u pogledu faze oblika vesla i istovremenog razvoja prstiju autopodijuma, mada i dalje sa jasnim preaksijalnim polaritetom (Franssen i sar., 2005).

1.3.1.3. MOLEKULARNI ASPEKTI RAZVIĆA EKSTREMITETA

Ključni signalni centri koji kontrolišu diferencijaciju skeletnih elemenata, kao što su apikalni ektodermalni greben (engl. *apical ectodermal ridge* (AER)) i zona polarizovane aktivnosti (engl. *zone of polarizing activity* (ZPA)), su prisutne kod repatih vodozemaca. Međutim, iako su mnogi aspekti razvića konzervativni, postoje i brojne razlike. Izražena razlika je odsustvo morfološki definisanog AER-a (Tank i sar., 1977). Kod tetrapoda, zgusnuta kapa koju sačinja više slojeva epitelijalnih ćelija, predstavlja mesto lučenja većeg broja različitih markera, uključujući Fgfs, koji formira povratni krug sa Shh u zoni ZPA, učestvujući u umnožavanju i rastu začetka ekstremiteta. Kod repatih vodozemaca, epidermis ima ulogu AER -a i po svemu sudeći obavlja njegovu ulogu, ali mu nedostaje diferencijacija ćelija kape (Bryant i Muneoka, 1986; Torok i sar., 1999). Osnovni geni koji su uključeni u formiranje ekstremiteta (engl. *limb patterning*) su identifikovani i kod repatih vodozemaca, pretežno sa

ciljem da se uporedi njihova uloga u normalnom razviću sa ulogom u procesu regeneracije ekstremiteta. Geni uključeni u specifikaciju identiteta prednjih odnosno zadnjih ekstremiteta su isti kao i kod ostalih tetrapoda: Ptx 1 i Tbx4 za prednje i Tbx5 za zadnje ekstremitete. Dalji razvoj je iniciran i regulisan na isti način u oba ekstremiteta. Složena serija genskih interakcija, koja uključuje veliki broj povratnih sprega, podstiče i održava rast ekstremiteta (Dudley i Tabin, 2000). Proksimo-distalni razvoj stilopodijuma, zeugopodijuma i autopodijuma je takođe sličan u oba ekstremiteta, sa odlučujućim uticajem ili vremenom koje ćelije provedu u zoni progresa (Wolpert, 2002) ili prostorne organizacije (Dudley i sar., 2002) mezenhima u začetku ekstremiteta. Iako postoje različita mišljenja u pogledu mehanizama diferencijacije parnih ekstremiteta, zna se da su *Hox* 9–13 paralogni geni (geni koji su duplirani veoma rano tokom evolucije grupe) odgovorni za formiranje odgovarajućih segmenata parnih ekstremiteta (Davis i sar., 1995), što je i potvrđeno studijama sa genetičkim ili fizičkim manipulacijama začetaka ekstremiteta (Wolpert, 2002). Gardiner i sar. (1995) su utvrdili da su obrasci delovanja *Hoxa* 13 i *Hoxa* 9 gena kod aksolotla slični sa drugim tetrapodama i da ispoljavaju istu vremensku i prostornu kolinearnost. Gen *Hoxa* 13 je uključen u struktuisanje distalnih elemenata i eksprimira se kasnije i više distalno nego *Hoxa* 9 gen koji je uključen u određivanje više proksimalnih elemenata ekstremiteta.

1.5. INTEGRACIJA I MODULARNOST U EKSTREMITETIMA

Ekstremiteti tetrapoda su serijalno homologe strukture i njihovo razviće je dobro proučeno. Zato oni služe kao model za razumevanje evolucije korelacione strukture i njenog odnosa prema zajedničkim razvojnim faktorima. Serijski homologe morfološke strukture nastaju udvajanjem razvojnih programa čitavih modula, pri čemu do njihove ekspresije dolazi na različitom mestu i/ili u različito vreme. Udvajanje i divergencija u programima razvića može, ali i ne

mora biti praćena divergencijom u obliku i strukturi ovako nastalih morfoloških struktura. Pored ekstremiteta, poznati primeri serijski homologih struktura kićmenjaka su i zubi, rebra, kićmeni pršljenovi, visceralni lukovi, nefroni bubrega. Pošto homologe morfološke strukture dele istu genetićku osnovu i programe razvića, ovakve strukture pokazuju i visok stepen morfološke integracije. Do disocijacije i individualizacije serijski homologih struktura dolazi zbog razlika u vremenu i mestu diferencijacije, kao i razlićitih sredinskih uticaja i funkcijskih zahteva (Wagner i Altenberg, 1996). Grupe sa bifazićnim životnim ciklusom, gde larveni, juvenilni i adultni stupanj imaju razlićite morfologije, ekološke sredine i preference, naćine ishrane i lokomocije, imaju posebno mesto u izućavanju ontogenetskih promena morfološke integracije.

Prema modelu koji su dali Hallgrímsson i sar. (2002), prednji i zadnji ekstemiteti kao serijski homologe strukture koje imaju zajednićku genetićku osnovu i razvojne puteve, ćine visoko integrisane celine. U ovom modelu kovariranje je hijerarijski struktuirano izmeću velićine tela, izmeću ekstremiteta, u okviru ekstremiteta izmeću homologih elemenata i u okviru elemenata. Ovaj model je saglasan sa morfološkim podacima razlićitih studija na sisarima i pticama. Hallgrímsson i sar. (2002) su na uzorku koga su ćinili fetalni miševi i adultni rezus majmuni dobili statistićki znaćajno kovariranje izmeću homologih elemenata ekstremiteta u odnosu na kovariranje u okviru ekstremiteta. Rezultati studija na pticama su takoće saglasni sa modelom (Van Valen, 1965a; Wright, 1968; Marcus, 1990; Magwene, 2001). Mećuđtim, kovariranje je veće u okviru ekstremiteta, a manje izmeću homologih elemenata. Bez obzira na razlike, rezultati ovih studija su saglasni da razvojni faktori imaju vaćnu ulogu u struktuiranju kovarianja unutar/izmeću ekstremiteta. Ukoliko je kovariranje ekstremiteta struktuirano zajednićkim razvojnim faktorima selekcija bi delovala na oba ekstremiteta na isti naćin. Pa tako selekcija na komponente proksimo-distalne organizacije ili rast jednog ekstremiteta bi najverovatnije na slićan naćin uticala i na drugi ekstremitet. Ovo kovariranje moće biti ogranićeno ukoliko selektivna prednost promena u jednom

ekstremitetu proizvodi selektivno „nepovoljnu“ promenu u drugom ekstremitetu. Ovo ne mora da bude slučaj u prirodi jer postoji ogromna raznovrsnost ekstremiteta u pogledu veličine, oblika i funkcije. Ova raznovrsnost se ne odnosi samo na specijalizaciju prednjih u odnosu na zadnje ekstremitete, nego i na određeni element u ekstremitetima (izduženi autopodijalni element kod ljljaka). Pretpostavka ovog modela je da specijalizacija ekstremiteta favorizuje redukciju kovariranja između ekstremiteta ili homologih elemenata (stilopodijuma, zeugopodijuma i autopodijuma). Redukovano kovariranje (smanjena razvojna ograničenja) bi dozvolilo nezavisnu selekciju na morfologiju prednjih i zadnjih ekstremiteta, čime se može objasniti evolucija raznovrsnosti ekstremiteta. Takođe, kovariranje između ekstremiteta bi trebalo da se smanji kao funkcija specijalizacije ekstremiteta (Hallgrímsson i sar., 2002). Ova hipoteza takođe ukazuje da je razilaženje forme ili funkcije, povezana sa redukcijom u relativnom značaju razvojnih faktora, povezanih sa oba ekstremiteta i relativno povećanje značaja razvojnih faktora koji samo utiču na prednje ili samo na zadnje ekstremitete. U suprotnom, obrasci kovariranja ekstremiteta mogu ostati nepromenjeni. Skoro nepromenjena kovarijaciona struktura kod različitih taksona bi ukazivala da selekcija za određeni fenotip nije obavezno ograničena kovariranjem između ekstremiteta. Razvojni faktori bi trebalo da budu relativno nepromenjeni takođe.

Empirijskim istraživanjama i analizom obrazaca variranja skeletnih elemenata prednjih i zadnjih ekstremiteta kod različitih grupa tetrapodnih kičmenjaka, moguće je utvrditi u kojoj meri su ograničenja (zajednička genetička osnova i razvojni putevi), a u kojoj je meri funkcija uticala na razdvajanje razvojnih puteva i specijalizaciju ekstremiteta (Young i sar., 2010).

1.5. OGRANIČENJA I EKSTREMITETI

1.5.2. BASIPODIALNA VARIJABILNOST

Postojanje razvojnih ograničenja u ekstremitetima su potvrđena u brojnim studijama, na različitim vrstama repatih vodozemaca (Alberch, 1980, 1983; Hanken, 1983; Rienesl i Wagner, 1992; Shubin i Wake, 1996). Opseg variranja je limitiran i distribucija realizovanih fenotipova pomerena ka određenim varijantama (Alberch, 1980, 1983). Unutarpopulaciona varijabilnost obrazaca variranja kod adultnih jedinki pokriva najveći deo filogenetske i morfološke raznovrsnosti unutar porodice *Salamandridae* (Rienesl i Wagner, 1992; Zaffaroni i sar., 1992; Shubin i sar., 1995; Shubin i Wake, 1996). Nivo variranja se razlikuje između populacija iste vrste (Rienesl i Wagner, 1992). Visok nivo variranja je prisutan kod hibridnih populacija i kod perifernih populacija, što se vezuje za opšti trend ka većoj varijabilnosti datih populacija u odnosu na centralnu populaciju (Hanken i Dinsmore, 1986; Rienesl i Wagner, 1992). Takođe, populacije koje imaju visok nivo varijabilnosti pokazuju u velikoj meri ograničen «obrazac variranja». Pa čak i u poređenju sa centralnim populacijama, ove populacije mogu imati izrazite promene u distribuciji određenih varijanti fenotipova (Hanken, 1983; Hanken i Dinsmore, 1986).

Razlike u obrascima variranja blisko srodnih vrsta su minimalne, dok su te razlike sve veće što su vrste udaljenije (Rienesl i Wagner, 1992). Varijante prisutne samo kod regenerisanih ekstremiteta jedne vrste predstavljaju normalne varijante u ekstremitetima druge vrste (Hanken i Dinsmore, 1986).

Paralelizam između varijanti prisutnih na populacionom nivou i variranja specifičnog za vrstu ili grupu srodnih vrsta, ukazuje da su mehanizmi uključeni u nastanak tih varijanti, isti kao oni koji su uključeni u stvaranje «sirove» varijabilnosti za evoluciono morfološku diversifikaciju. Opaženi obrasci se mogu objasniti kao produkt heterohronične regulacije «elastičnih razvojnih programa». Ali ono što je važno je da realizovano variranje nije

slučajno i da u velikoj meri oslikava strukturu razvojnog programa koji ograničava njegovu ekspresiju (Alberch, 1983).

1.5.2. HETEROHRONIČNE PROMENE

Repati vodozemci predstavlja grupu na čiju evoluciju veliki uticaj imaju heterohronične promene (Alberch i Alberch, 1981; Wake i sar, 1983; Wake, 1986; Hanken, 1989; Hinchliffe i Vorobyeva, 1999; Buckley i sar, 2007). Evolucija različitih delova tela, načini reprodukcije, kao i kompleksni životni ciklus su povezani sa ovim modifikacijama (Hanken, 1992; Bruce i sar., 2003). Heterohronija i larvene adaptacije imaju važnu ulogu u diversifikaciji distalnog dela ekstremiteta kod repatih vodozemaca (Blanco i Alberch, 1992; Vorobyeva, 2009). Takođe, različite studije kod repatih vodozemaca su utvrdile da male heterohronične promene mogu proizvoditi funkcionalno i ekološki značajnu fenotipsku varijabilnost (Alberch i Alberch, 1981; Denoël, 2002; Denoël i sar., 2005).

Rezultati heterohronije mogu biti: funkcionalna promena adultne morfologije, funkcionalna promena u larvenoj morfologiji (sa ili bez promene kod adultnih jedinki), ili promena ne mora biti povezana sa selekcijom za adaptivne osobine ekstremiteta (Richardson i sar., 2009). Heterohronične promene u razviću ekstremiteta mogu stvoriti promene i u drugim sistemima, stvarajući plejotropni efekat. Mogući primer je funkcionalna plejotropija koju čine Hox D klaster geni, koji su važni za razviće/organizaciju ne samo ekstremiteta, već i osnovne ose simetrije tela i genitalnih organa (Dolle i sar., 1993). Takođe, u nekim slučajevima heterohronija nema vidljive veze sa selekcijom ili ograničenjima, već ima slučajan raspored. Chipman i sar. (2000) su analizirali heterohronične promene kod 12 vrsta žaba tokom organogeneze, i utvrdili odsustvo veze tih promena sa filogenijom ili sa nekim adaptivnim scenarijem.

Heterohronični obrasci prisutni u larvenoj fazi ne moraju imati uticaj na adultnu morfologiju. Oni mogu biti selektovani za funkcionalne efekte ranih faza životnog ciklusa. Takve adaptacije se označavaju kao cenogeneza (Blanco i Alberch, 1992). Holmgren (1939) je predložio adaptivno objašnjenje za obrasce pojave prednjih i zadnjih ekstremiteta kod vodozemaca; tačnije, za raniji razvoj prednjih ekstremiteta kod repatih vodozemaca, i obrnuti obrazac kod bezrepih vodozemaca. On je predložio da je raniji razvoj zadnjih ekstremiteta kod žaba povezan sa njihovom ulogom u kretanju; kod metamorfozirane jedinke zadnji ekstremiteti se koriste za plivanje, a kod adultnih jedinki za kretanje u skokovima. U okviru repatih vodozemaca, heterohronične promene su snažno povezane sa karakteristikama staništa larvi, i ne moraju imati uticaj na adultnu morfologiju (Blanco i Alberch, 1992; Shubin, 1995). Tako je kod vrsta čije larve naseljavaju bare (kao što su *Ambystoma mexicanum* ili vrste roda *Triturus*) prisutno ubrzanje razvoja prednjih u odnosu na zadnje ekstremitete; kod vrsta sa larvom koja naseljava potoke (*Dicamptodon tenebrosus*) i vrsta sa direktnim razvićem (*D. aeneus*), postoji manji stepen ubrzanja razvića prednjih ekstremiteta, pa se može govoriti o skoro istovremenom pojavljivanju prednjih i zadnjih ekstremiteta (Wake i Shubin, 1998; Franssen i sar., 2005).

Ranije razviće preaksijalno položenih prstiju kod grupe Caudata, u odnosu na obrazac sa četvrtim prstom, kao glavnom osom kod bezrepih vodozemaca i amniota, se često posmatra kao adaptivno rešenje (Blanco i Alberch, 1992; Hinchliffe i Vorobyeva, 1999). Pomoću razvijenih preaksijalnih prstiju (prvi i drugi prst), larve repatih vodozemaca mogu se lakše kretati i držati za supstrat (Hinchliffe i Vorobyeva, 1999). Međutim, Holmgren (1933) je ovo objašnjenje odbacio tvrdnjom da iako repati vodozemci dele preaksijalnu dominaciju, ipak imaju larve koje se razlikuju u karakteristikama staništa.

2. CILJEVI STUDIJE

Veliki krestasti mrmoljci predstavljaju važne model organizme za istraživanja u oblasti morfološke integracije i razvojnih ograničenja, posebno ako se analiziraju ekstremiteti. Sa jedne strane to je grupa blisko srodnih vrsta sa poznatim filogenetskim odnosima, koje imaju različite preference prema akvatičnoj/terestričnoj sredini, tačnije, neke vrste su više akvatične, sa izduženim telom i kratkim nogama, dok su druge vrste više terestrične sa snažnim telom i dugim nogama. Takođe, kao grupa sa složenim životnim ciklusom koji podrazumeva postojanje akvatične larve koja procesima metamorfoze postaje terestrična juvenilna jedinka, što kada su ekstremiteti u pitanju, otvara pitanje različitih odnosa, uticaja i ograničenja sredinskih faktora i ontogenetskih putanja tokom razvića. Ontogenetska promena niše i tranzicija između akvatične i terestrične sredine je povezana sa procesom metamorfoze. Iako ekstremiteti mrmoljaka ne prolaze kroz drastične promene strukture tokom tog procesa, funkcionalni zahtevi za efikasnom lokomocijom u te dve sredine su bitno različiti. Pretpostavka je da razlike između vrsta u pogledu stepena korišćenja akvatične tj. terestrične lokomocije, može biti faktor koji doprinosi razlikama u dužinama skeletnih elemenata i različitim obrascima korelacija između elemenata ekstremiteta, oslikavajući adaptacije na različite uslove sredine i način života (više ili manje akvatičan-terestričan).

U ovoj studiji analizirana je ontogenetska dinamika morfološke varijabilnosti ekstremiteta i efekat različitih funkcionalnih zahteva ontogenetskih stupnjeva u pogledu lokomocije. Takođe, analizirana je morfološka varijabilnost ekstremiteta sa aspekta filogenetskih odnosa blisko srodnih vrsta sa različitim preferencama prema tipu staništa i načinu života, koja ukazuje na pravce evolucionih promena u nivou i obrascima varijabilnosti ekstremiteta mrmoljaka.

U skladu sa prethodno navedenim definisani su sledeći osnovni ciljevi studije:

1. utvrđivanje ontogenetskih i filogenetskih promena u nivou i strukturi morfološke integracije i modularnosti ekstremiteta velikih mrmoljaka

2. utvrđivanje uticaja razvojnih ograničenja na morfološku varijabilnost ekstremiteta velikih mrmoljaka, prvenstveno uticaj modularnosti, integracije, kao i uticaj heterohroničnih promena na evoluciju ekstremiteta.

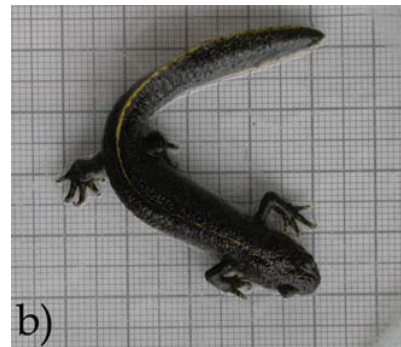
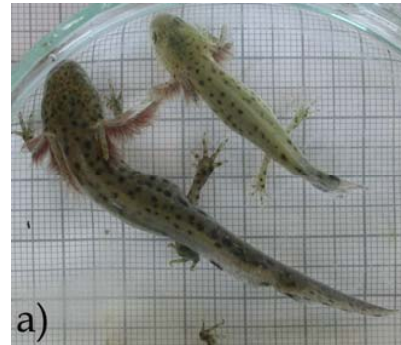
3. MATERIЈAL I METODE

3.1. PREGLED ANALIZIRANIH UZORAKA POPULACIJA MRMOLJAKA

Analizirani uzorak se sastojao od jedinki pet vrsta velikih krestastih mrmoljaka sa teritorije Srbije, Crne Gore, Slovenije i Makedonije: *Triturus cristatus*, *Triturus dobrogicus*, *Triturus macedonicus*, *Triturus karelinii* i *Triturus carnifex*.

Ontogenetski aspekti varijabilnosti ekstremiteta su dobijeni analizom tri ontogenetske tačke/ ontogenetska stupnja:

- larveni stupanj pre početka metamorfoze (larve u trećoj četvrtini larvenog razvića, starosti 112 dana ili po Glucksohn-u (1932), stupanj 62 sa razvijenim ekstremitetima);
- juvenilni stupanj, sa jedinkama koje su upravo prošle kroz proces metamorfoze (sa potpuno zatvorenim škržnim prorezima i potpuno resorbovanim škragama (Duellman i Trueb, 1994)), (Slika 1.)
- adultni stupanj, sa polno zrelim jedinkama (utvrđeno po prisustvu sekundarnih polnih karakteristika i zrelih gonadama).



SLIKA 1. Ontogenetski stupnjevi analizirani u studiji; a) larveni stupanj, b) juvenilni stupanj, c) adultni stupanj.

Sve analizirane jedinke su deo Batrahološke zbirke, Instituta za biološke nauke „Siniša Stanković“, Beograd, Srbija. Jedinke vrste *T. cristatus* potiču sa lokaliteta Miroč, Srbija (44°29'N, 22°20'E, 440 m a.s.l), vrste *T. dobrogicus* sa lokaliteta Svetozar Miletić, Srbija (20°41'N, 19°12'E, 100 m a.s.l.), vrste *T. karelinii* potiču sa dva lokaliteta: Vlasi, Srbija (42°59'N, 22°38'E, 470 m a.s.l.) i Berovo, Makedonija (41°43'N, 22°52'12'E, 900 m a.s.l.), vrste *T. macedonicus* sa lokaliteta Rid, Crna Gora (42 °22'N, 18°57'E, 250 m a.s.l.), vrste *T. carnifex* sa lokaliteta Podstrmec, Slovenija (45 °48'N, 14°34' E, 556 m a.s.l.) (Slika 2.).



SLIKA 2. Pregled geografskog položaja lokaliteta analiziranih vrsta (*T. carnifex*-roze, *T.dobrogicus*-plavo, *T.cristatus*-zeleno, *T.macedonicus*-ljubičasto, *T. karelinii*-žuto obojene oznake).

Larve i juvenilne jedinke su dobijene u dva laboratorijska eksperimenta, i predstavljaju potomstvo gravidnih ženki koje potiču iz prirodnih populacija (Slika 3.). 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 *T. 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 Ljubotinij (42° 23' N, 19° 07' E, 225m). Jedinke vrste *T. karelinii* su sakupljene u aprilu 2008. godine u okolini Pirota, na lokalitetu Borovsko polje (42° 58' N, 22° 43' E, 890m, 8 ženki). Sve ženke, koje su prikupljene na samom početku perioda reprodukcije i polaganja jaja, su imale vidno uvećan abdomen, a mužjaci jasno izražene dorzalne kreste.



SLIKA 3. Fotografije koje ilustruju različite faze eksperimenta.

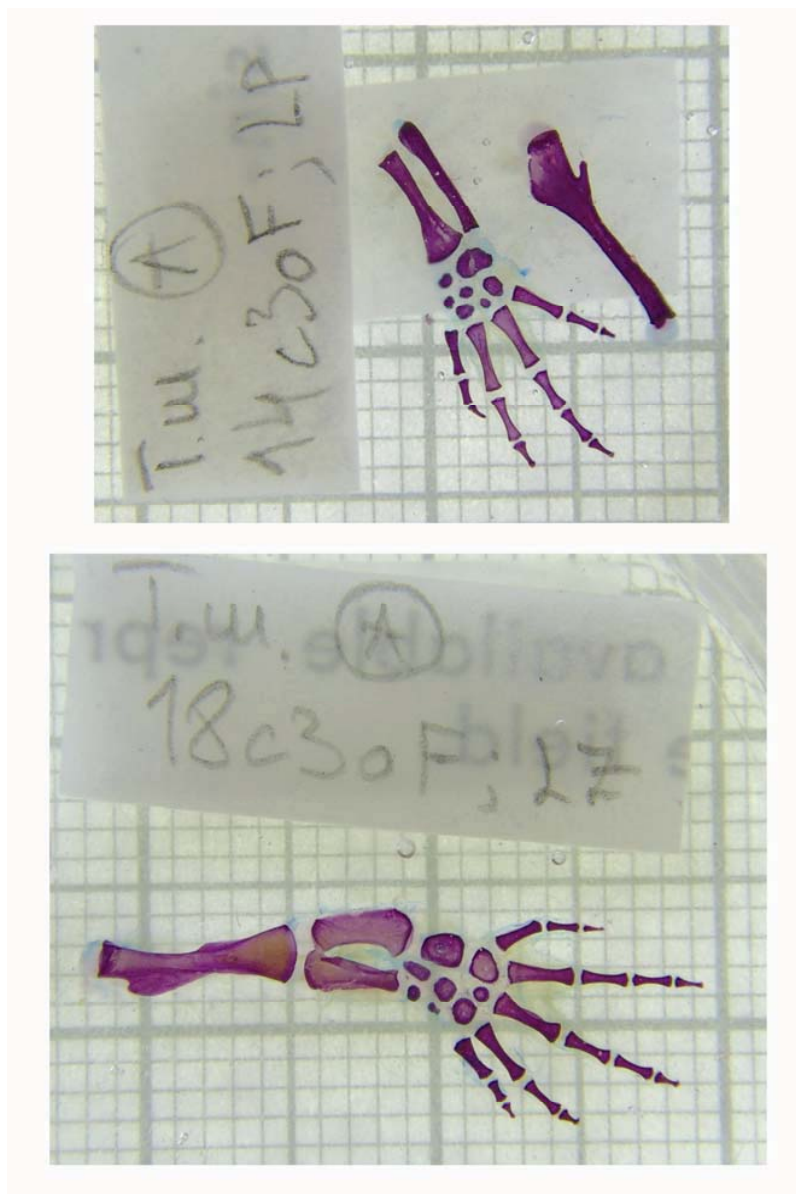
Zbog različitih optimalnih temperatura koje su karakteristične za ove vrste, eksperiment je organizovan u različitim kontrolisanim i konstantnim eksperimentalnim uslovima. Tako su vrste *T. dobrogicus* i *T. cristatus* gajene na temperaturi od 16-17 °C, dok su vrste *T. macedonicus* i *T. karelinii* gajene na 18-19 °C.

Gravidne ženke su smeštane pojedinačno u akvarijume zapremine 12 litara sa 6 litara dehlorisane vode (Slika 3.). Voda je menjana svakih 7 do 10 dana. Životinje su hranjene svaki drugi dan crvima muva i *Tubifex* crvićima. U akvarijume su postavljene po dve providne PVC trake, koje su služile kao podloga za polaganje jaja. Svakodnevno je praćeno prisustvo položenih jaja. Tek položena jaja su skidana sa traka i prebacivana u petri kutije (prečnika 5cm, napunjene sa dehlorisanom vodom), sa maksimalnim brojem od deset jaja. Voda u petri kutijama je menjana svaki drugi dan. Po izvaljivanju, larve su smeštane u plastične čaše (zapremine 100ml sa dehlorisanom vodom), sa maksimalnim brojem do tri larve. Voda je menjana svaki drugi dan. Larve su hranjene račićima roda *Artemia*, odnosno krupnije larve hranjene su sa *Tubifex* crvićima. Po dostizanju starosti od 30 dana od izvaljivanja, larve su prebacivane u plastične kutije zapremine 1 litar u kojima su nastavljale razviće sve do metamorfoze. Za metamorfozirane jedinke uzimane su jedinke kod kojih su spoljašnje škrge bile potpuno resorbovane i škržni otvori potpuno zatvoreni.

3.2. METODE PROSVETLJAVANJA MEKOG TKIVA I DIFERENCIJALNOG BOJENJA KOSTI I PRIKUPLJANJE OSNOVNIH PODATAKA

Za pripremu skeleta korišćena je standardna procedura izbeljivanja mekog tkiva i bojenja hrskavice i kosti. Procedura je bila sledeća: tkivo je rehidratirano serijom etanola različite koncentracije, izmenom 50% etanola, 30% etanola i destilovane vode u procesu koji je trajao 24 h. Skeleti su zatim prvo bojani bojom Alcian blue za diferencijalno bojenje hrskavice u rastvoru sa sirćetnom kiselinom. Prosvetljavanje tkiva vršeno je enzimom tripsinom

(Trypsine TYPE2 S). Skeleti su potom prebačeni u 0.5% rastvor kalijum hidroksida (KOH) i 3% vodonik-peroksid (H₂O₂) i držani na jako osvetljenom mestu. Zatim su bojeni bojom Alizarin Red S za diferencijalno bojenje kosti. Očišćeni i obojeni skeleti sačuvani su u glicerinu sa timolom (Dingerkus i Uhler, 1977).



SLIKA 4. Fotografije prednjeg i zadnjeg ekstremiteta adultne jedinke vrste *Triturus macedonicus*.

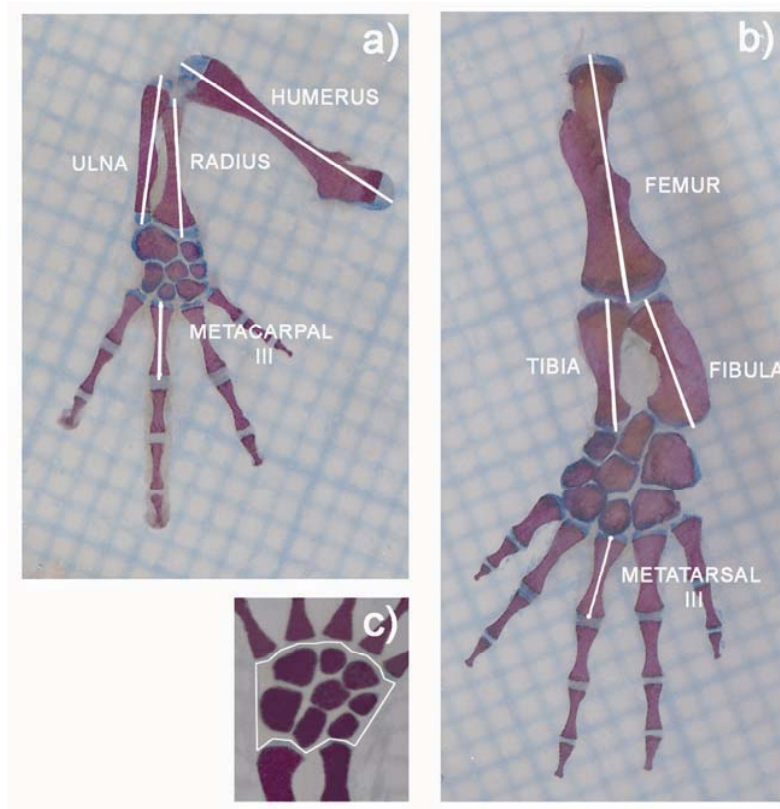
Skeletni elementi adultnih jedinki su zajedno sa skalom u milimetrima, skenirani korišćenjem skenera CanoScan 5200F (Canon), sa rezolucijom 1200 dpi (24bit). Preostali deo uzorka, larvene i juvenilne jedinke su fotografisane zajedno sa skalom u milimetrima, digitalnim foto-aparatom Sony DSC F828 (rezolucija 8.0 MP, Sony Corp., Tokyo, Japan). Da bi se umanjio ili izjednačio efekat paralakse, skeletni elementi su postavljeni u petrijeve kutije (veličine 3.5"), ispunjene sa 2.5ml glicerina i preklopljeni poklopcima petrijevih kutija (Hallgrimsson i sar., 2002) (Slika 4.).

3.3. ANALIZE

3.3.1. ODREĐIVANJE DUŽINA ELEMENATA EKSTREMITETA

Maksimalne dužine skeletnih elemenata oba prednja ekstremiteta (H-humerus, R-radius, U-ulna i MC-metakarpalni element III), kao i oba zadnja ekstremiteta (F-femur, T-tibia, Fi-fibula i MT-metatarzalni element III), dobijene su korišćenjem programa TpsDig2 (Rohlf, 2005) i Tmorphgen6 (Sheets, 2001) (Slika 5.). Pozicioniranje odabranih tačaka, koje su predstavljale krajnje tačke normalne na uzdužnu osu svakog analiziranog elementa ekstremiteta, izvršeno je u programu za digitalizaciju specifičnih tačaka TpsDig2 (Rohlf, 2005).

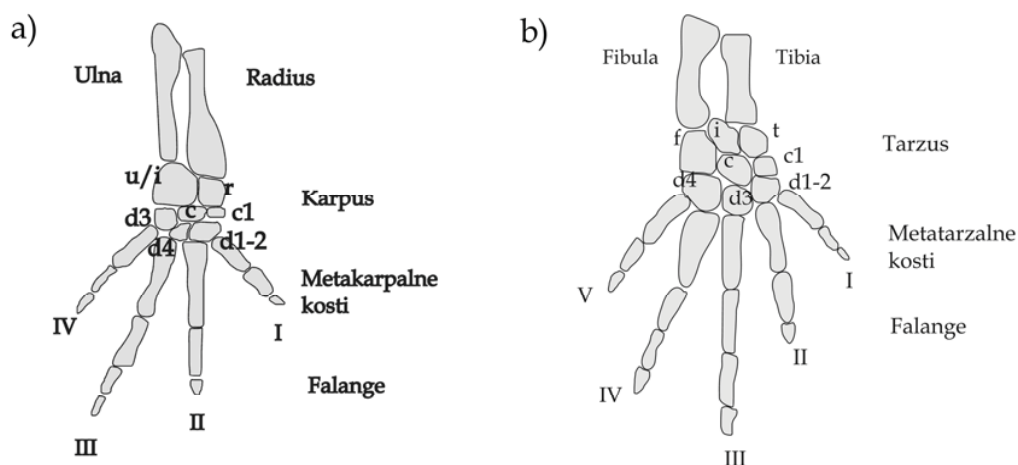
Dimenzije skeletnih elemenata (u milimetrima), izračunate kao Euklidsko rastojanje između odabranih parova tačaka, dobijene su u Tmorphgen6 IMP programskog paketa (Sheets, 2001). Za dalje analize korišćene su srednje vrednosti levog i desnog ekstremiteta.



SLIKA 5. Odabrane tačke koje predstavljaju maksimalnu vrednost dužina elemenata ekstremiteta. a) prednji ekstremiteti, b) zadnji ekstremiteti, c) površina na osnovu koje je procenjen nivo osifikacije basipodijuma.

3.3.2. VARIJABILNOST ELEMENATA BASIPODIJUMA I FALANGI PRSTIJU

Svaki ekstremitet (prednji, zadnji, levi, desni) je detaljno pregledan na prisustvo spojenih, nedostajućih ili prekobrojnih elemenata mesopodiuma, kao i falangialnih elemenata (Slika 6.). Ukupan broj jedinki po vrstama je dat u Tabeli 1. Ekstremiteti koji su oštećeni tokom procedure nisu dalje korišćeni za analizu varijabilnosti u basipodijumu. Takođe, falange sa izmenjenim oblikom (račvaste ili previše skraćene) nisu korišćene za dalje analize zbog moguće greške usled moguće regeneracije delova prstiju.



SLIKA 6. Šema tipičnog rasporeda elemenata basipodijuma kod velikih mrmolja. a) prednji ekstremiteti; u/i-ulnare-intermedium, r-radiale, c-centrale, c1-centrale 1, d1-2-distalni karpalni element 1-2, d3-distalni karpalni element 3, d4-distalni karpalni element 4; b) zadnji ekstremiteti; f-fibulare, i-intermedium, t-tibiale, c-centrale, c1-centrale 1, d1-2-distalni tarzalni element 1-2, d3-distalni tarzalni element 3, d4-distalni tarzalni element 4; I-V-prsti.

Sledeći metodologiju prethodnih studija na utvrđivanju obrazaca variranja elemenata basipodijuma (Rienesl i Wagner, 1992; Zaffaroni i sar., 1999), utvrđeni su prisutni obrasci variranja za celokupni uzorak. Učestalosti distribucija (engl. *frequency distribution*) su poređene G-testom sa Williamsovom korekcijom (Sokal i Rohlf, 1981).

TABELA 1. Pregled broja jedinki po vrstama za analizu basipodijalne varijabilnosti.

	<i>T.carnifex</i>	<i>T.cristatus</i>	<i>T.dobrogicus</i>	<i>T.karelinii</i>	Ukupno
N	28	31	26	20	105
PREDNJI EKSTREMITETI	58	64	56	20	198
ZADNJI EKSTREMITETI	58	64	58	40	220

3.3.3. ODREĐIVANJE STEPENA PRISUSTVA KOŠTANOG TKIVA U BASIPODIJUMU

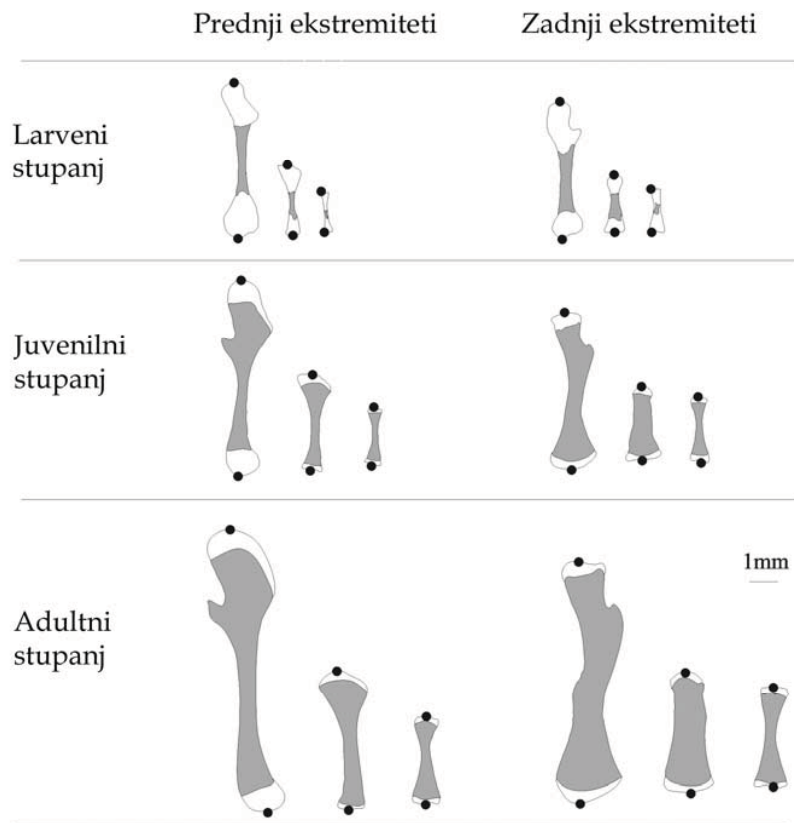
Stepen osifikacije karpusa i tarzusa, procenjen je na osnovu odnosa osifikovanog tkiva u odnosu na okolno tkivo u osnovi šake i stopala i utvrđen je kao procentualni udeo koštanog tkiva u karpusu ili tarzusu. Procentualni udeo hrskavičavog tkiva nije bilo moguće utvrditi zbog slabije obojenosti hrskavice, ali i različitog intenziteta plave boje u celokupnom uzorku. Utvrđivanjem stepena osifikacije na osnovu odnosa površine osnove šake i površine osifikovanog tkiva, je kvantifikovana razlika u nivou osifikacije između vrsta (Slika 5. (c)). Statističke značajnosti razlika u nivou osifikacije između polova i vrsta su dobijene korišćenjem neparametarskog Kruskal-Wallis testa.

3.3.4. MORFOLOŠKA INTEGRACIJA

3.3.4.1. PRIPREMA PODATAKA

Analiza morfološke integracije je urađena na šest osobina prednjih i zadnjih ekstremiteta sledećih vrsta: *Triturus cristatus*, *T. dobrogicus*, *T. arntzeni* i *T. macedonicus*. Analizirana su dva elementa stilopodijuma (humerus i femur), dva elementa zeugopodijuma (radius i tibia) i dva elementa autopodijuma (metakarpalni element III i metatarzalni element III) (Slika 7.). Broj jedinki po stupnju i vrsti je dat u Tabeli 2.

Pošto razlike u dužini tela mogu dovesti do razlika u nivou i obrascima integracija između različitih osobina, osnovni (sirovi) podaci su korigovani za razlike vezane za pol, ontogenetski stupanj, populaciju i vrstu.



SLIKA 7. Grafički prikaz prednjih i zadnjih ekstremiteta u različitim fazama ontogenetskog razvića. Raspored elemenata sa leve na desnu stranu: prednji ekstremiteti-humerus, radius, metakarpalni element III; zadnji ekstremiteti-femur, tibia, metatarzalni element III. Sive zone označavaju osifikovane delove, dok su hrskavičavi delovi predstavljeni belom bojom. Svi skeletni elementi pripadaju vrsti *T. macedonicus*.

Procedura se sastojala u izračunavanju geometrijske sredine za svaku grupu i regresiji svake osobine na geometrijsku sredinu date grupe (Ackermann, 2005). Time su dobijeni podaci oslobođeni veličine. Korigovani podaci su korišćeni u daljim analizama.

TABELA 2. Pregled broja jedinki i ukupnog broja elemenata koji su mereni po stupnju i vrstama za analizu morfološke integracije.

	LARVENI STUPANJ		JUVENILNI STUPANJ		ADULTNI STUPANJ	
	N	broj elemenata	N	broj elemenata	N	broj elemenata
<i>T.cristatus</i>	5	30	10	60	31	185
<i>T.dobrogicus</i>	18	97	31	172	30	165
<i>T.karelinii</i>	18	103	28	163	40	237
<i>T.macedonicus</i>	18	77	33	194	24	138

3.3.4.2. MATRICE KORELACIJA, PONOVLJIVOST, KORIGOVANE MATRICE KORELACIJA

U ovoj studiji su korišćene matrice korelacija za poređenje korelisanosti struktura između ontogenetskih stupnjeva i između vrsta za svaki stupanj. Korelacione matrice svih šest elemenata (tri za prednje ekstremitete i tri za zadnje ekstremitete) svakog stupnja i vrste su poređene međusobno. Sa ciljem utvrđivanja da li su analizirane matrice međusobno sličnije nego slučajno generisane matrice korišćen je Mantelov test (Mantel, 1967) sa 10.000 ponavljanja. Dve matrice se smatraju statistički značajno sličnim ukoliko opažena korelacija prelazi 95% od slučajno generisanih korelacija.

Da bi se ispitaio efekat greške uzorka, originalni podaci su uzorkovani sa ponavljanjem, i korelacione matrice su kreirane 10.000 puta. Nove matrice su poređene sa originalnom matricom i dobijene su vrednosti za ponovljivost matrice, *t*. Ponovljivost je dalje korišćena za procenu teorijske maksimalne matrice korelacija (R_{max}):

$$R_{\max} = \sqrt{(t_a * t_b)},$$

gde su t_a i t_b vrednosti za ponovljivost matrica koje se porede. Vrednosti dobijene za maksimalne matrice korelacija su korišćene za dobijanje korigovane matrice korelacija (R_{adj}):

$$R_{\text{adj}} = R_{\text{obs}} / R_{\max},$$

za dve poređene matrice, gde je R_{obs} izračunata matrica korelacija (Marroig i Cheverud, 2001).

3.3.4.3. INTEGRACIJA

Stepen morfološke integracije je procenjen na osnovu indeksa integracije, koji uključuje izračunavanje varijansi sopstvenih vrednosti (engl. *variance of eigenvalues*, VE) za svaki ontogenetski stupanj analiziranih vrsta (Wagner, 1984). Zbog malog i nejednakog broja jedinki u celokupnom uzorku, procene varijabilnosti i kovariranja mogu biti nerealne (Cheverud, 1989). Da bi se smanjila moguća greška, korišćena je korekcija za malu veličinu uzorka:

$$E(V(\lambda)) = (M-1)/N,$$

gde je M broj osobina, N broj jedinki u uzorku, i $E(V(\lambda))$ očekivana varijansa sopstvenih vrednosti VE (Wagner, 1984; Cheverud, 1989). Visokim vrednostima korelacija između osobina odgovaraju visoke vrednosti varijansi sopstvenih vrednosti VE, jer se najveći deo variranja može objasniti jednom ili sa samo nekoliko sopstvenih vrednosti. Niske vrednosti korelacija između osobina odgovaraju nižim vrednostima VE što ukazuje na jednaku raspodelu varijanse. Varijansa sopstvenih vrednosti se linearno skalira sa kvadratom srednjih korelacija, i bolje opisuje sveukupnu morfološku integraciju u odnosu na prosečne korelacije (Pavlicev i sar., 2009). Značajnost razlika između vrsta u varijansi sopstvenih vrednosti je izračunata putem ponovnog uzorkovanja sa ponavljanjem i ponovnim izračunavanjem VE (Manly, 1991), dok je kao test statistika korišćen odnos/razlika vrednosti VE dve analizirane grupe. Statistička značajnost je dobijena kao odnos broja iteracija u kojima vrednost

odnosa prevazilazi originalan odnos baziran na 10.000 permutacija. Sva izračunavanja su urađena u dodatnom programu vezanom za Excel (PopTools 2.62, CSIRO, Canberra (Hood, 2004)).

Pored koeficijenta integracije, stepen integrisanosti osobina se može proceniti i na osnovu Fišerovih z-transformisanih korelacija. Ova transformacija je važna jer korelacije nemaju normalnu distribuciju. Osobine su organizovane u setove (module) za koje su izračunate Fisherove z-transformisane korelacije koje su izračunate za svaku grupu postupkom ponovnog uzorkovanja sa ponavljanjem, originalnih podataka (10.000 ponavljanja). Analiza je obuhvatila sledeće hipotetičke funkcionalne i razvojne module:

- Prednji i zadnji ekstremiteti,
- Prednji ekstremiteti (humerus, radius, metakarpalni element III),
- Zadnji ekstremiteti (femur, tibia, metatarzalni element III),
- Proksimalni delovi ekstremiteta (prednji: humerus-radius, zadnji: femur-tibia),
- Homologi elementi (humerus-femur, radius-tibia, metakarpalni element III-metatarzalni element III),
- Nehomologi elementi (humerus-radius, humerus-tibia, humerus-metakarpalni element III, humerus-metatarzalni element III, radius-femur, radius-metakarpalni element III, radius-metatarzalni element III, metakarpalni element III-femur, metakarpalni element III-tibia, femur-tibia, femur-metatarzalni element III, tibia-metatarzalni element III).

3.3.4.4. PARCIJALNE KORELACIJE-MODULARNOST

Da bi se dobilo više informacija o strukturi integracije ekstremiteta kod različitih ontogenetskih stupnjeva i vrsta, osnovni podaci su analizirani korišćenjem parcijalnih korelacija. Parcijalne korelacije predstavljaju korelaciju između dve osobine nezavisno od informacija o drugim osobinama iz korelacione matrice. Statistička značajnost parcijalnih korelacija je dobijena na

osnovu teorijske mere koja je poznata kao devijacija ivičnog isključenja (engl. *edge exclusion deviance*, EED) i χ^2 (hi-kvadrat) distribucije:

$$EED = -N \ln(1 - \rho^2_{ij\{K\}}),$$

gde je N broj jedinki u uzorku, i $\rho^2_{ij\{K\}}$ parcijalni korelacioni koeficijenti između osobina i i j (Magwene, 2001). Dve osobine su uslovno nezavisne kada je vrednost EED manja od 3,84 (što odgovara statističkoj značajnosti nivoa $P=0,05$, $df=1$ preuzeto iz tablice χ^2 distribucije)).

3.3.4.5. DISPARITET U DUŽINI ELEMENATA EKSTREMITETA

Da bi se testirale razlike u varijansi dužine elemenata ekstremiteta između ontogenetskih stupnjeva analiziranih vrsta, korišćen je Levenov test (Young i sar., 2009). Prateći preporuke Van Valen-a (2005), prvo je određena srednja vrednost dužine svakog elementa ekstremiteta posebno za svaki ontogenetski stupanj, a zatim apsolutne vrednosti razlika između originalnih podataka i dobijenih srednjih vrednosti.

3.3.5. ALOMETRIJSKI ODNOSI ELEMENATA EKSTREMITETA

Analiza alometrijskih odnosa je urađena na ukupno osam osobina, četiri elementa prednjih ekstremiteta (humerus, radius, ulna, metakarpalni element III), i četiri elementa zadnjih ekstremiteta (femur, tibia, fibula, metatarzalni element III). Dužina tela merena kao rastojanje od vrha nosa do kraja kloake (engl. *snout vent length*, SVL) je korišćena kao približna mera veličine tela. Osnovni podaci su logaritmovani da bi se ispunili uslovi normalnosti distribucije i homogenosti varijanse. Pregled vrsta i broj jedinki po stupnju dat je u Tabeli 3.

Obrasci alometrijskih odnosa između vrsta su analizirani na osnovu multivarijantne i bivarijantne statistike. Da bi se grafički lakše uočile razlike

koje mogu postojati između vrsta u alometrijskom rastu, određen je alometrijski prostor u seriji od dve analize glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analyses*, PCA). Prva analiza (PCA) je urađena odvojeno za svaku vrstu koristeći logaritmovane podatke. Vektori prve ose (PC1) za svaku vrstu su zatim korišćeni za drugu PC analizu pri čemu su vrste unošene kao jedinke. Vrednosti glavnih komponenti za prve dve ose, određuju položaj vrsta u alometrijskom prostoru. Svaka vrsta je prikazana jedinstvenom tačkom koja predstavlja sumu specifičnih za vrstu alometrijskih putanja. Analize su urađene koristeći programski paket Statistica 6 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA).

TABELA 3. Pregled broja jedinki po stupnju i vrstama za analizu alometrijske i sekvencijalne heterohronije.

	LARVENI STUPANJ	JUVENILNI STUPANJ	ADULTNI STUPANJ
	N	N	N
<i>T.cristatus</i>	5	10	31
<i>T.dobrogicus</i>	14	28	25
<i>T.macedonicus</i>	12	32	22

Za analizu odnosa između dužina elemenata ekstremiteta i ukupne dužine tela, korišćen je model regresije tipa II, model standardizovanih glavnih osa (engl. *Standardized Major Axis*). Ovim tipom regresije se minimalizuje suma kvadrata odstupanja tako što se određuje najkraća distanca od položaja date tačke do regresione prave, pa se ovaj model smatra najprihvatljivijim za procenu koeficijenata alometrije (Warton i sar., 2006). Analizirani uzorak svake vrste je podeljen na dve grupe. Prvu grupu čine larvene i juvenilne jedinke, dok se u drugoj grupi nalaze juvenilne i adultne jedinke. Na taj način je analiziran alometrijski rast pre i u toku metamorfoze, kao i rast posle metamorfoze. Osnovni parametri regresione krive su utvrđeni za svaki element ekstremiteta i određenu grupu. Prisustvo zajedničke krivulje rasta je procenjeno metodom maksimalne verododstoynosti (engl. *likelihood ratio test*). Kada je utvrđeno

postojanje zajedničke krive, testirano je pomeranje grupa u odnosu na ordinatu ili pomeranje duž zajedničke regresione krive, poređenjem rezidualnih i zadatih skorova osa putem Waldove statistike (engl. Wald statistic) (Falster i sar., 2006; Warton i sar., 2006). U slučajevima sa statistički značajnom heterogenošću kriva regresija između grupa, korišćena su post- hoc poređenja da se utvrdi koje se grupe najviše razlikuju.

3.3.6. SEKVENCIJALNA HETEROHRONIJA

3.3.6.1. PGI ANALIZA

Metoda nazvana „genetičko zaključivanje“ na osnovu Parsimov analize (engl. *Parsimov based genetic inference* - PGI), je korišćena da bi se rekonstruisale evolucione promene u relativnom redosledu vremena osifikacije skeletnih elemenata, osifikacionih događaja (Harrison i Larsson, 2008).

PGI tretira vremensku sekvencu razvojnih događaja kao jedinstveni, ali složeni karakter. Ova metoda analizira hipoteze o promeni redosleda nekog događaja u razvojnoj sekvenci, na svakoj grani ispitivane filogenije, na osnovu minimalnog broja sekvencijalnih heterohronija potrebnih za objašnjenje razlika između predačke i potomačke razvojne sekvence (Harrison i Larsson, 2008).

Analiza je urađena na prednjim ekstremitetima sa 16 događaja; pojava osifikacije u elementima: Humerus-H, Radius-R, Ulna-U, Metakarpalni element I-MC 1, Metakarpalni element II-MC II, Metakarpalni element III-MC III, Metakarpalni element IV-MC IV, prva falanga prvog prsta-Ph 1.1, druga falanga prvog prsta-Ph 1.2, prva falanga drugog prsta-Ph 2.1, druga falanga drugog prsta Ph 2.2, prva falanga trećeg prsta-Ph 3.1, druga falanga trećeg prsta-Ph 3.2, treća falanga trećeg prsta-Ph-3.3, prva falanga četvrtog prsta-Ph 4.1, druga falanga četvrtog prsta-Ph 4.2) (Tabela 4 (A)).

Analiza na zadnjim ekstremitetima je obuhvatala 20 događaja; pojava osifikacije u elementima: Femur-F, Fibula-Fi, Tibia-T, Metatarzalni element I-MT I, Metatarzalni element II-MT II, Metatarzalni element III, MT III,

Metatarzalni element IV-MT IV, Metatarzalni element V-MT V, prva falanga prvog prsta-Ph 1.1, druga falanga prvog prsta-Ph 1.2, prva falanga drugog prsta-Ph 2.1, druga falanga drugog prsta Ph 2.2, prva falanga trećeg prsta-Ph 3.1, druga falanga trećeg prsta-Ph 3.2, treća falanga trećeg prsta-Ph-3.3, prva falanga četvrtog prsta-Ph 4.1, druga falanga četvrtog prsta-Ph 4.2, treća falanga četvrtog prsta-Ph4.3, prva falanga petog prsta-Ph 5.1, druga falanga petog prsta-Ph 5.2) (Tabela 4 (B)).

PGi program je imao sledeće parametre: 100 sekvenci po ciklusu selekcije, 100 ciklusa selekcije, 100 sekvenci po čvorištu. Dozvoljeno je da predačka sekvenca ima mogućnost istovremene promene dva ili više događaja (engl. *simultaneity*), a procena je vršena pomoću funkcije Parsimov modela (engl. *edit cost function; Parsimov model with greedy heuristic*).

TABELA 4. Redosled osifikacionih događaja u ekstremitetima četiri vrste mrmoljača. A) Prednji ekstremiteti, B) Zadnji ekstremiteti.

<i>TABELA (A): PREDNJI EKSTREMITETI</i>				
	<i>T.</i> <i>cristatus</i>	<i>T.</i> <i>dobrogicus</i>	<i>T.</i> <i>macedonicus</i>	<i>T. marmoratus</i> <i>(Blanco i Alberch, 1992)</i>
1 <i>Humerus</i>	1	1	1	1
2 <i>Radius</i>	2	2	2	1
3 <i>Ulna</i>	2	3	3	1
4 <i>Os metacarpale I</i>	8	10	9	5
5 <i>Os metacarpale II</i>	4	5	5	2
6 <i>Os metacarpale III</i>	3	4	4	3
7 <i>Os metacarpale IV</i>	5	6	7	5
8 <i>Phalanges 1.1</i>	10	12	13	7
9 <i>Phalanges 1.2</i>	12	15	14	
10 <i>Phalanges 2.1</i>	6	8	8	2
11 <i>Phalanges 2.2</i>	11	13	11	3
12 <i>Phalanges 3.1</i>	4	7	6	4
13 <i>Phalanges 3.2</i>	7	9	8	4
14 <i>Phalanges 3.3</i>	11	13	10	4
15 <i>Phalanges 4.1</i>	9	11	9	6
16 <i>Phalanges 4.2</i>	13	14	12	7

Da bi rekonstruisali evolucione promene u relativnoj promeni redosleda osifikacionih događaja kod velikih mrmoljaka, neophodan je van grupni član. Korišćena osifikaciona sekvenca pripada vrsti *T. marmoratus*, koja zajedno sa vrstom *T. pygmeus* čini sestrinsku grupu velikim mrmoljcima. Podaci o osifikacionoj sekvenci *T. marmoratus*, (Madrid, Španija) je dobijena iz literature (Blanco i Alberch, 1992).

TABELA . Nastavak. B) Zadnji ekstremiteti

TABELA (B): ZADNJI EKSTREMITETI				
	<i>T. cristatus</i>	<i>T. dobrogicus</i>	<i>T. macedonicus</i>	<i>T. marmoratus</i> (Blanco i Alberch, 1992)
1 <i>Femur</i>	1	1	1	1
2 <i>Tibia</i>	2	2	2	1
3 <i>Fibula</i>	3	3	3	1
4 <i>Os metatarsale I</i>	12	11	8	4
5 <i>Os metatarsale II</i>	5	6	6	2
6 <i>Os metatarsale III</i>	4	4	4	2
7 <i>Os metatarsale IV</i>	4	5	5	3
8 <i>Os metatarsale V</i>	10	12	8	7
9 <i>Phalanges 1.1</i>	14	17	13	8
10 <i>Phalanges. 1.2</i>	17	20	14	6
11 <i>Phalanges 2.1</i>	8	10	9	2
12 <i>Phalanges 2.2</i>	16	14	11	4
13 <i>Phalanges 3.1</i>	6	7	7	3
14 <i>Phalanges 3.2</i>	9	9	10	5
15 <i>Phalanges 3.3</i>	14	16	11	5
16 <i>Phalanges 4.1</i>	7	8	9	5
17 <i>Phalanges 4.2</i>	11	13	10	6
18 <i>Phalanges 4.3</i>	14	18	12	6
19 <i>Phalanges 5.1</i>	13	15	13	8
20 <i>Phalanges 5.2</i>	18	19	14	7

3.3.6.2. RANK ANALIZA - RANGIRANJE DOGAĐAJA PO VARIJABILNOSTI

Variranje u redosledu osifikacionih događaja je opisano pomoću rank analize. Osnovni podaci tj. sekvence osifikacionih događaja su skalirane na osnovu formule: $(r-1)/(r_{\max}-1)$, gde je r apsolutni rang određenog osifikacionog događaja, a r_{\max} je ukupan broj rangova za svaku vrstu (Koyabu i sar., 2011).

Na ovaj način formira se korigovana osifikaciona sekvenca koja ima vrednosti od 0 do 1 kod svih vrsta. Opseg korigovanih rangova za svaki element koji se računa kao razlika između maksimalne i minimalne vrednosti ranga za taj element, je korišćen kao mera varijabilnosti elementa u osifikacionoj sekvenci. Pošto na ovu analizu mogu uticati sekvencijalne heterohronične pojave, kao i veličina uzoraka (Maxwell i sar., 2010), rezultati se koriste samo za analizu nivoa razlika između velikih i mramorastih mrmoljaka. Rang analiza je urađena u Excel-u.

4. REZULTATI

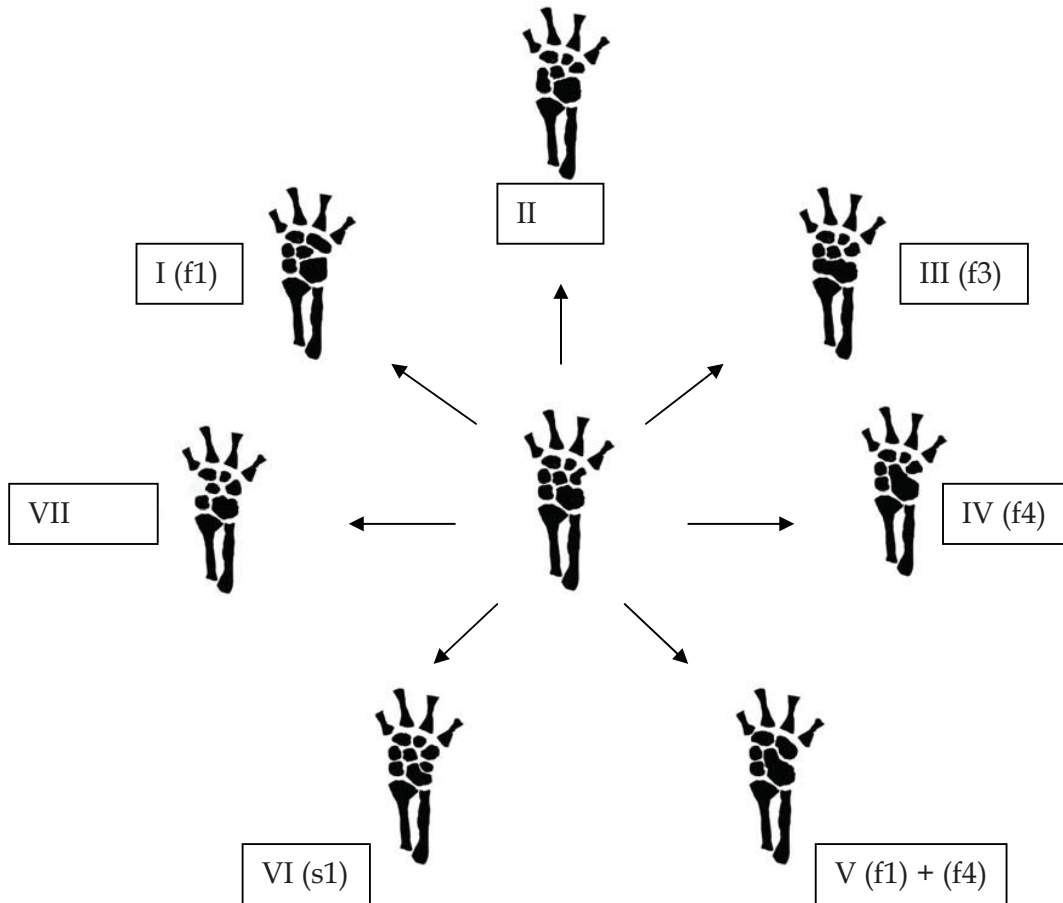
4.1. VARIRANJE BASIPODIJUMA

Karpus velikih mrmoljaka se sastoji iz sedam odvojenih elemenata: ulnare/intermedium (*lat., os carpi ulnare/intermedium*), radiale (*lat., os carpi radiale*), centrale (*lat., os carpi centrale*), centrale 1 (*lat., os carpi centrale 1*), distalni karpalni elementi 1-2, 3 i 4 (*lat., ossa carpi 1-2, 3, 4*) (pogledati u Shubin i Alberch, 1986) (Slika 6.). U analiziranom uzorku pronađeno je pet različitih karpalnih fuzija, jedan prekobrojni element i dva slučaja nedostajućih elemenata (Tabela 5.).

TABELA 5. Pregled različitih karpalnih i tarzalnih fuzija, nedostajućih i prekobrojnih elemenata, kao i obrazaca basipodijanog variranja u prednjim i zadnjim ekstremitetima.

PREDNJI EKSTREMITETI	ZADNJI EKSTREMITETI
FUZIJE (F)	
1. distalni karpalni element 3 + distalni karpalni element 4	5. fibulare + distalni karpalni element 4
2. radiale + centrale 1	
3. radiale + ulnare/intermedium	
4. ulnare/intermedium + centrale	
NEDOSTAJUĆI ELEMENTI (M)	
1.c1	
PREKOBROJNI ELEMENTI (S)	
1. raspadom ulnare/intermedium	2. između distalnog tarzalnog elementa 1,2 i centrale
OBRASCI BAZIPODIALNOG VARIRANJA	
F(1)	F(5)
F(2)	S(2)
F(3)	
F(4)	
F(1)+(4)	
M(1)	
S(1)	

Fuzija f(1) se sastoji od antero-posteriorno položenih distalnih karpalnih elemenata 3 i 4. Fuzija f(2) sadrži proksimo-distalno spojene elemente radiale i centrale 1. Fuzija f(3) kombinuje anteriorno-posteriorno položen elemente radiale sa elementom ulnare/intermediumom. Fuziju f(4) čine elementi ulnare/intermedium i centrale. Prekobrojni element s(1) je verovatno rezultat sekundarnog odvajanja normalno spojenih ulnare/intermedium.



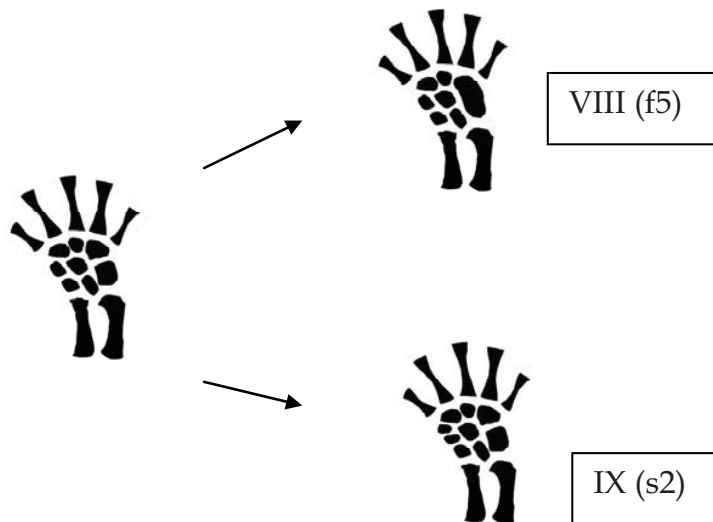
SLIKA 8. Tipični i opaženi basipodijalni obrasci prednjih ekstremiteta.

Nedostajući element m(1) se odnosi na odsustvo elementa centrale 1. Različite kombinacije opaženih fuzija, prekobrojnih i nedostajućih elemenata je dovelo do prisustva sedam različitih karpalnih obrazaca. Različiti basipodijalni

obrasci variranja činili su grupacije karpalnih elemenata od minimum 5 i maksimalno 8 odvojenih karpanih elemenata (Slika 8.).

Od ukupno 196 analiziranih basipodijuma, 14 se razlikovalo od tipičnog obrasca, što čini 7,1% od ukupnog uzorka. Razlike između vrsta u pogledu obrazaca karpalnog variranja nisu statistički značajne ($G=3,710$; $P>0.294$).

Tarzus velikih mrmoljaka se sastoji od 8 odvojenih elemenata: fibulare (lat., *os tarsi fibulare*), intermedium (lat., *os tarsi intermedium*), tibiale (lat., *os tarsi tibiale*), centrale (lat., *os tarsi centrale*), centrale 1 (lat., *os tarsi centrale 1*), distalnih tarzalnih elemenata 1-2, 3 i 4 (lat., *os tarsi 1-2, 3,4*) (Slika 6.). Samo dva od 213 analiziranih basipodijuma se razlikovao od tipičnog za ove vrste, što predstavlja 0.9% od ukupnog broja (Tabela 5.). U zadnjim ekstremitetima je utvrđeno prisustvo dva varijabilna tarzalna obrasca (Slika 9.). Iako su oba varijabilna tarzalna obrasca bila prisutna kod vrste *T. carnifex*, nije pronađena statistički značajna razlika između vrsta u obrascima variranja tarzusa kod velikih mrmoljaka. Tarzalna fuzija f(5) između proksimo-distalnog fibulare i distalnog tarzalnog elementa 4 i prekobrojni element s(2) leži između distalnog tarzalnog elementa 1-2 i centrale 1.



SLIKA 9. Tipični i opaženi basipodijalni obrasci zadnjih ekstremiteta.

U našem uzorku, tipični obrazac građe karpusa i tarzusa je prisutan kod 90.5% jedinki. Izuzetak je analizirana populacija vrste *T. karelinii*, gde nije uočeno variranje ni u karpusu, ni u tarzusu. Slučajevi nedostajućih elemenata su utvrđeni samo za vrstu *T. dobrogicus*. Takođe, kod vrste *T. dobrogicus* je pronađeno 4 simetrična slučajeva fuzije f(2) i nedostajućeg elementa m(1).

Analiza je pokazala da je karpus mnogo varijabilniji od tarzusa kod velikih mrmoljaka što se slaže sa podacima za druge populacije *T. carnifex* i *T. cristatus* (Rienesl i Wagner, 1992; Zaffaroni i sar., 1999) kao i druge vrste repatih vodozemaca (*Plethodon cinereus*, Hanken i Dismore, 1986).

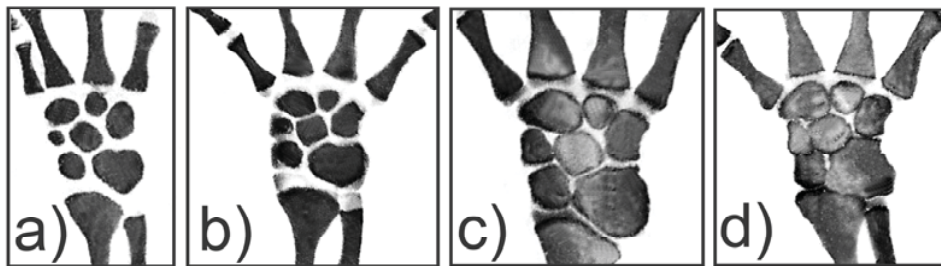
Tipična falangealna formula je 2-2-3-2 za prednje ekstremitete i 2-2-3-3-2 za zadnje ekstremitete (Rabl, 1910). Varijabilni deo je činio 9.0% (29 ekstremiteta) od ukupnog broja analiziranih ekstremiteta (323 ekstremiteta). Variranje se pretežno odnosi na redukciju u broju falangi, ali su takođe i prekobrojne falange bile prisutne i u prednjim i u zadnjim ekstremitetima. Dve jedinke vrste *T. karelinii* su imale izmenjene prste sa specifičnom formulom: 2/3-3/3-4-3 i 2-2-3/2-2. Preostali deo uzorka nije imao toliko izmenjene prste. Razlike između vrsta u falangealnoj formuli nisu statistički značajne, što je potvrđeno G testom, za prednje ekstremitete (G=4088, P>0.252) i zadnje ekstremitete (G=1.625, P>0.654). Takođe, uočeno je da je odnos promena koje predstavljaju redukciju skoro uvek procentualno veći od promena koje predstavljaju povećanje broja falangialnih elemenata u formuli.

4.2. NIVO OSIFIKACIJE

Na osnovu vizuelnog pregleda obrazaca varijabilnosti basipodijuma utvrđeno je da postoji veliko variranje u nivou osifikacije i rasporedu pakovanja koštanog i hrskavičavog tkiva kod različitih vrsta mrmoljaka (Slika 10.). Da bi se kvantifikovale ove razlike, procenjena je ukupna površina basipodijuma i površina osifikovanog dela. Na taj način gustina koštanog pakovanja je procenjena na osnovu odnosa koštanog tkiva i ukupne površine basipodijuma i

data je kao procentualni deo. Neparаметarski Kruskal-Walis test je korišćen za procenu razlika u nivou osifikacije. Nije pronađena statistički značajna razlika u procentualnoj zastupljenosti osifikacije između polova ni kod jedne analizirane vrste, ni za prednje, ni za zadnje ekstremitete ($P > 0.05$ u svim poređenjima). Zbog toga su spojeni uzorci različitih polova za poređenje nivoa osifikacije između vrsta. Statistički značajne razlike u nivou osifikacije su pronađene između vrsta. Poređenje po parovima je pokazalo da vrsta *T. dobrogicus* ima najniži nivo osifikacije i znatno labaviji raspored kostiju u basipodijumu (prednji ekstremiteti: srednja vrednost=56.1%, opseg=23.2%-74.4%; zadnji ekstremiteti: srednja vrednost=61.2%, opseg=43.5%-77.4%) od ostalih vrsta mrmoljaka ($P < 0.01$ za sva poređenja). Nivo osifikacije kod vrste *T. cristatus* (prednji ekstremiteti: srednja vrednost=72.8%, opseg=60.2%-82.8%; zadnji ekstremiteti: srednja vrednost=72.4%, opseg=62.1%-82.4%) i kod vrste *T. carnifex* (prednji ekstremiteti: srednja vrednost=75.0%, opseg=55.8%-83.6%; zadnji ekstremiteti: srednja vrednost=70.2%, opseg=41.5%-82.8%) je imao najveće vrednosti i mnogo gušće pakovanje koštanih elemenata u basipodijumu, dok je nivo osifikacije kod vrste *T. karelinii* bio nešto niži (prednji ekstremiteti: srednja vrednost=69.9%, opseg=32.7%-82.3%; zadnji ekstremiteti: srednja vrednost=66.0%, opseg=28.8%-76.6%).

SLIKA 10. Razlike u nivou osifikacije i gustini pakovanja kostiju basipodijuma prednjih ekstremiteta četiri vrste velikih mrmoljaka; a) *T. dobrogicus*, b) *T. karelinii*, c) *T. cristatus*, d) *T. carifex*.



Statistički značajna razlika između ove tri vrste je pronađena samo za vrste *T. cristatus* i *T. karelinii* za nivo osifikacije zadnjih ekstremiteta ($P < 0.01$). Ostala poređenja po parovima nisu otkrila statistički značajne razlike između vrsta *T. carnifex*, *T. cristatus* i *T. karelinii* ($P > 0.05$). Ove tri vrste se za razliku od vrste *T. dobrogicus* odlikuju dobro okoštanim basipodijumom.

4.3. MORFOLOŠKA INTEGRACIJA

Ponovljivost matrica kod svih vrsta i stupnjeva je srednja do visoka sa vrednostima u opsegu 0.67-0.94; izuzetak je larvelni stupanj vrste *T. macedonicus* gde je ponovljivost niska i iznosi 0.43. Najniža ponovljivost je karakteristična za larveni stupanj, najverovatnije zbog male veličine uzorka i odsustva kompletnih podataka (Tabela 6.).

TABELA 6. Matrične korelacije između sukcesivnih ontogenetskih stupnjeva u okviru svake vrste. Poređenja koja su statistički značajno slična pri $P < 0.05$ su podvučena.

Vrsta	Stupanj 1	Stupanj 2	t1	t2	Maksimalne korelacije	Opažene korelacije	Korigovane korelacije	P (10,000 ponavljanja)
<i>T. cristatus</i>	Larveni	Juvenilni	0.78	0.72	0.75	-0.24	-0.33	0.732
	Juvenilni	Adultni	0.72	0.91	0.81	-0.13	-0.17	0.363
	Larveni	Adultni	0.78	0.91	0.84	0.10	0.11	0.642
<i>T. dobrogicus</i>	Larveni	Juvenilni	0.74	0.81	0.78	-0.01	-0.01	0.472
	Juvenilni	Adultni	0.81	0.94	0.88	0.06	0.07	0.095
	Larveni	Adultni	0.74	0.94	0.83	0.41	0.49	0.436
<i>T. karelinii</i>	Larveni	Juvenilni	0.78	0.71	0.75	<u>0.46</u>	0.62	0.047
	Juvenilni	Adultni	0.71	0.93	0.81	<u>0.81</u>	1.00	0.016
	Larveni	Adultni	0.78	0.93	0.85	<u>0.49</u>	0.57	0.010
<i>T. macedonicus</i>	Larveni	Juvenilni	0.43	0.67	0.54	0.05	0.09	0.448
	Juvenilni	Adultni	0.67	0.82	0.74	0.45	0.60	0.567
	Larveni	Adultni	0.43	0.82	0.60	-0.05	-0.08	0.052

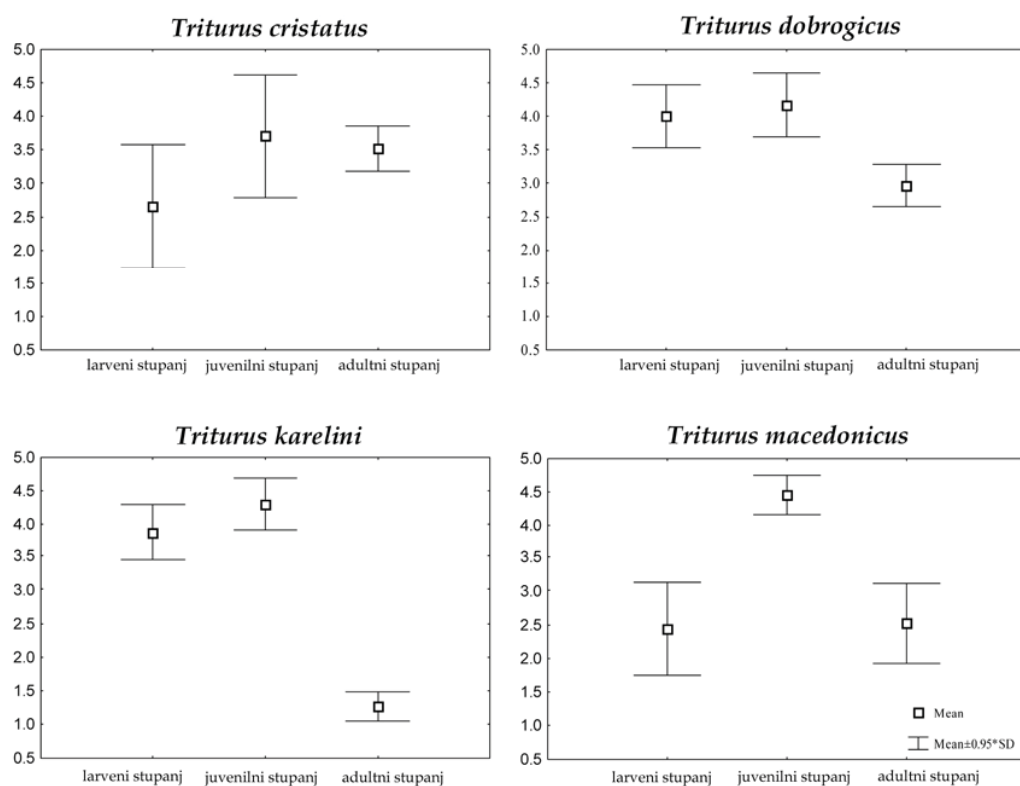
Poređenje korelacionih matrica između susednih ontogenetskih stupnjeva u okviru svake vrste je pokazalo da se korelaciona struktura značajno menja tokom ontogenije. Izuzetak je vrsta *T. karelinii*, kod koje postoji usklađenost u

obrascima korelisanosti elemenata ekstremiteta između ontogenetskih stupnjeva (Tabela 6.). U Tabeli 7. su prikazani rezultati interspecijskog poređenja odgovarajućih ontogenetskih stupnjeva. Vrednosti matričnih koeficijenata korelacija su generalno veći nego koeficijenti dobijeni između susednih ontogenetskih stupnjeva u okviru svake vrste.

TABELA 7. Matrične korelacije za određene ontogenetske stupnjeve između različitih vrsta mrmoljaka. Poređenja sa nivoom statističke značajnosti od $P < 0.05$ su podvučena.

Stupanj	Vrsta 1	Vrsta 2	t1	t2	Maksimalne korelacije	Opazene korelacije	Korigovane korelacije	P (10,000 ponavljanja)
Larveni	<i>cristatus</i>	<i>dobrogicus</i>	0.78	0.74	0.76	-0.16	-0.21	0.664
	<i>cristatus</i>	<i>karelinii</i>	0.78	0.78	0.78	-0.03	-0.04	0.664
	<i>cristatus</i>	<i>macedonicus</i>	0.78	0.43	0.58	0.18	0.31	0.351
	<i>dobrogicus</i>	<i>karelinii</i>	0.74	0.78	0.76	<u>0.68</u>	0.90	0.024
	<i>dobrogicus</i>	<i>macedonicus</i>	0.74	0.43	0.56	<u>0.62</u>	1.10	0.016
	<i>karelinii</i>	<i>macedonicus</i>	0.78	0.43	0.58	<u>0.69</u>	1.19	0.003
Juvenilni	<i>cristatus</i>	<i>dobrogicus</i>	0.72	0.81	0.76	<u>0.59</u>	0.77	0.039
	<i>cristatus</i>	<i>karelinii</i>	0.72	0.71	0.71	<u>0.42</u>	0.59	0.026
	<i>cristatus</i>	<i>macedonicus</i>	0.72	0.67	0.69	-0.34	-0.49	0.850
	<i>dobrogicus</i>	<i>karelinii</i>	0.81	0.71	0.76	<u>0.41</u>	0.54	0.015
	<i>dobrogicus</i>	<i>macedonicus</i>	0.81	0.67	0.74	-0.12	-0.16	0.623
	<i>karelinii</i>	<i>macedonicus</i>	0.71	0.67	0.69	0.17	0.25	0.251
Adultni	<i>cristatus</i>	<i>dobrogicus</i>	0.91	0.94	0.92	<u>0.74</u>	0.80	0.038
	<i>cristatus</i>	<i>karelinii</i>	0.91	0.93	0.92	0.38	0.41	0.111
	<i>cristatus</i>	<i>macedonicus</i>	0.91	0.82	0.86	<u>0.59</u>	0.68	0.012
	<i>dobrogicus</i>	<i>karelinii</i>	0.94	0.93	0.93	0.06	0.06	0.427
	<i>dobrogicus</i>	<i>macedonicus</i>	0.94	0.82	0.88	0.21	0.24	0.234
	<i>karelinii</i>	<i>macedonicus</i>	0.93	0.82	0.87	<u>0.48</u>	0.55	0.023

Vrednosti za VE izračunate za svaki ontogenetski stupanj i svaku vrstu ukazuje da nivo integracije varira tokom ontogenije (Slika 11.). Međutim, poređenja vrednosti VE između ontogenetskih stupnjeva u okviru svake vrste su pokazala da nema statistički značajne razlike između ontogenetskih stupnjeva kod analiziranih vrsta.



SLIKA 11. Grafički prikaz varijanse sopstvenih vrednosti (VE) izračunate putem ponovnog uzorkovanja sa ponavljanjem, za četiri vrste velikih mrmoljaka. Kvadrat predstavlja srednju vrednost ponovno uzimanog uzorka, sa opsegom koji čini 95% standardne devijacije srednje vrednosti.

Prosečne Fišerove z-transformisane korelacije su pokazale strukturalne razlike između matrica posebno između korelacionih struktura kod vrsta *T. karelinii* i *T. dobrogicus* (Tabela 8.). Prosečne korelacije unutar ekstremiteta/između elemenata istog ekstremiteta su bile veće nego korelacije između homologih elemenata ekstremiteta kod vrsta *T. karelinii* i delimično kod vrsta *T. macedonicus*. Kod vrsta *T. dobrogicus* i *T. cristatus*, korelacije unutar ekstremiteta su bile niže nego korelacije između homologih elemenata (izuzev za juvenilni stupanj kod zadnjih ekstremiteta gde su korelacije bile veće nego korelacije za prednje ekstremitete i homologe elemente ekstremiteta).

TABELA 8. Prosečne Fišerove z-transformisane korelacije između različitih teorijski pretpostavljenih modula.

stupanj	<i>T. cristatus</i>				<i>T. dobrogicus</i>				<i>T. karelinii</i>				<i>T. macedonicus</i>			
	Larveni	Juvenilni	Adultni	Larveni	Juvenilni	Adultni	Larveni	Juvenilni	Adultni	Larveni	Juvenilni	Adultni	Larveni	Juvenilni	Adultni	
Prednji ekstremiteti	0.76	1.16	1.28	1.44	1.26	0.79	1.32	1.46	1.02	0.76	1.56	1.15				
Zadnji ekstremiteti	2.04	1.86	1.12	1.16	1.65	0.98	1.40	1.52	1.00	0.72	1.30	0.81				
Humerus-radius	2.22	1.32	1.52	1.62	1.26	1.33	1.56	1.76	1.72	1.21	1.64	1.45				
Femur-tibia	2.46	2.07	1.83	1.26	1.76	1.49	1.56	1.76	1.90	0.48	1.36	1.52				
Nehomologi	1.03	1.36	1.07	1.27	1.33	0.85	1.28	1.36	0.57	0.81	1.38	0.87				
Homologi	0.70	1.44	1.29	1.42	1.37	1.59	1.19	1.38	0.17	1.06	1.45	0.73				
Ukupno	0.96	1.42	1.12	1.30	1.34	1.00	1.26	1.37	0.49	0.84	1.39	0.85				

Odnos prosečnih korelacija između homologih i nehomologih elemenata ekstremiteta je različit. Kod vrste *T. dobrogicus* i *T. cristatus*, korelacije između homologih elemenata su veće nego između nehomologih elemenata. Međutim, suprotan odnos je utvrđen kod vrsta *T. karelini* i *T. macedonicus*. Kod svih analiziranih vrsta korelacije su veće na juvenilnom stupnju nego na adultnom stupnju razvića (Tabela 8.).

Analiza parcijalnih korelacija je utvrdila da je juvenilni stupanj, stupanj sa najznačajnijim korelacijama između elemenata istog ekstremiteta i između elemenata različitih ekstremiteta kod svih analiziranih vrsta mrmoljaka (Slika 12.).

	<i>Triturus cristatus</i>	<i>Triturus dobrogicus</i>	<i>Triturus karelini</i>	<i>Triturus macedonicus</i>																																																												
Larveni stupanj		<table border="1"> <tr><td>H</td><td></td><td>F</td></tr> <tr><td>0.60</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>R</td><td></td><td>T</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>MC</td><td>0.51</td><td>MT</td></tr> </table>	H		F	0.60			R		T				MC	0.51	MT	<table border="1"> <tr><td>H</td><td></td><td>F</td></tr> <tr><td>0.79</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>R</td><td></td><td>T</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>MC</td><td></td><td>MT</td></tr> </table>	H		F	0.79			R		T				MC		MT																															
H		F																																																														
0.60																																																																
R		T																																																														
MC	0.51	MT																																																														
H		F																																																														
0.79																																																																
R		T																																																														
MC		MT																																																														
Juvenilni stupanj	<table border="1"> <tr><td>H</td><td>0.73</td><td>F</td></tr> <tr><td>0.73</td><td></td><td>0.82</td></tr> <tr><td>R</td><td></td><td>T</td></tr> <tr><td>-0.62</td><td></td><td>-0.73</td></tr> <tr><td>MC</td><td>0.93</td><td>MI</td></tr> </table>	H	0.73	F	0.73		0.82	R		T	-0.62		-0.73	MC	0.93	MI	<table border="1"> <tr><td>H</td><td>0.56</td><td>F</td></tr> <tr><td>0.44</td><td></td><td>0.64</td></tr> <tr><td>R</td><td>0.56</td><td>T</td></tr> <tr><td>0.43</td><td></td><td>0.82</td></tr> <tr><td>MC</td><td>0.59</td><td>MI</td></tr> </table>	H	0.56	F	0.44		0.64	R	0.56	T	0.43		0.82	MC	0.59	MI	<table border="1"> <tr><td>H</td><td>0.60</td><td>F</td></tr> <tr><td>0.79</td><td></td><td>0.78</td></tr> <tr><td>R</td><td></td><td>T</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>MC</td><td>0.62</td><td>MI</td></tr> </table>	H	0.60	F	0.79		0.78	R		T				MC	0.62	MI	<table border="1"> <tr><td>H</td><td>0.65</td><td>F</td></tr> <tr><td>0.72</td><td></td><td>0.37</td></tr> <tr><td>R</td><td>0.55</td><td>T</td></tr> <tr><td>0.65</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>MC</td><td></td><td>MI</td></tr> </table>	H	0.65	F	0.72		0.37	R	0.55	T	0.65			MC		MI
H	0.73	F																																																														
0.73		0.82																																																														
R		T																																																														
-0.62		-0.73																																																														
MC	0.93	MI																																																														
H	0.56	F																																																														
0.44		0.64																																																														
R	0.56	T																																																														
0.43		0.82																																																														
MC	0.59	MI																																																														
H	0.60	F																																																														
0.79		0.78																																																														
R		T																																																														
MC	0.62	MI																																																														
H	0.65	F																																																														
0.72		0.37																																																														
R	0.55	T																																																														
0.65																																																																
MC		MI																																																														
Adultni stupanj	<table border="1"> <tr><td>H</td><td>0.48</td><td>F</td></tr> <tr><td>0.64</td><td></td><td>0.79</td></tr> <tr><td>R</td><td></td><td>T</td></tr> <tr><td>0.53</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>MC</td><td>0.76</td><td>MT</td></tr> </table>	H	0.48	F	0.64		0.79	R		T	0.53			MC	0.76	MT	<table border="1"> <tr><td>H</td><td>0.67</td><td>F</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>R</td><td>0.47</td><td>T</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>MC</td><td>0.90</td><td>MT</td></tr> </table>	H	0.67	F				R	0.47	T				MC	0.90	MT	<table border="1"> <tr><td>H</td><td></td><td>F</td></tr> <tr><td>0.91</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>R</td><td></td><td>T</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>MC</td><td></td><td>MT</td></tr> </table>	H		F	0.91			R		T				MC		MT	<table border="1"> <tr><td>H</td><td></td><td>F</td></tr> <tr><td>0.72</td><td></td><td>0.92</td></tr> <tr><td>R</td><td>0.41</td><td>T</td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>MC</td><td></td><td>MT</td></tr> </table>	H		F	0.72		0.92	R	0.41	T				MC		MT
H	0.48	F																																																														
0.64		0.79																																																														
R		T																																																														
0.53																																																																
MC	0.76	MT																																																														
H	0.67	F																																																														
R	0.47	T																																																														
MC	0.90	MT																																																														
H		F																																																														
0.91																																																																
R		T																																																														
MC		MT																																																														
H		F																																																														
0.72		0.92																																																														
R	0.41	T																																																														
MC		MT																																																														

SLIKA 12. Grafički prikaz statistički značajnih parcijalnih korelacija ($P < 0.05$).

Kod adultnog stupnja vrste *T. dobrogicus* i *T. karelini* imaju suprotne obrasce korelisanosti. Kod vrste *T. dobrogicus* statistički značajne korelacije su prisutne samo između homologih elemenata ekstremiteta. Ovaj rezultat je suprotan u odnosu na vrstu *T. karelini* kod koje su pronađene visoke parcijalne korelacije između elemenata istog ekstremiteta i to između elemenata stilopodijuma i zeugopodijuma. Kod vrste *T. karelini* su utvrđene najslabije veze

između prednjih i zadnjih ekstremiteta. Parcijalne korelacije između elemenata ekstremiteta vrste *T. cristatus* i *T. macedonicus* su po intezitetu između prethodnih vrsta sa statistički značajnim ivicama između homologih elemenata i elemenata jednog ekstremiteta.

TABELA 9. Varijansa dužine elemenata ekstremiteta i P vrednosti na osnovu Levenovog testa. Poređenja sa nivoom statističke značajnosti od $P < 0.05$ su podvučena.

	Stupanj	Varijansa					
		H	R	MC	F	T	MT
<i>T. cristatus</i>	Larveni	0.017	0.005	0.002	0.041	0.002	0.004
	Juvenilni	0.072	0.022	0.009	0.089	0.017	0.012
	Adultni	0.178	0.040	0.045	0.098	0.040	0.060
<i>T. dobrogicus</i>	Larveni	0.040	0.008	0.003	0.034	0.007	0.005
	Juvenilni	0.042	0.024	0.010	0.057	0.021	0.023
	Adultni	0.074	0.028	0.032	0.087	0.035	0.074
<i>T. arntzeni</i>	Larveni	0.090	0.014	0.002	0.013	0.006	0.003
	Juvenilni	0.052	0.032	0.015	0.058	0.024	0.011
	Adultni	0.280	0.066	0.046	0.240	0.077	0.047
<i>T. macedonicus</i>	Larveni	0.022	0.007	0.002	0.022	0.003	0.012
	Juvenilni	0.040	0.022	0.010	0.047	0.016	0.010
	Adultni	0.097	0.038	0.013	0.086	0.041	0.026

Disparitet u dužini elemenata ekstremiteta se znatno razlikuje između ontogenetskih stupnjeva i između vrsta.

Najniža varijansa je povezana sa larvenim stupnjem dok je variranje dužina elemenata ekstremiteta bilo najveće kod adultnog stupnja (Tabela 9.).

TABELA 9. Nastavak.

		P-vrednost					
		H	R	MC	F	T	MT
<i>T. cristatus</i>	Larveni/Juvenilni	0.396	0.430	0.184	0.694	0.126	0.469
	Larveni/Adultni	<u>0.035</u>	0.051	<u>0.014</u>	0.225	0.063	<u>0.013</u>
	Juvenilni/Adultni	0.062	0.086	<u>0.034</u>	0.212	0.189	<u>0.022</u>
<i>T. dobrogicus</i>	Larveni/Juvenilni	0.757	0.091	0.101	0.086	0.098	<u>0.016</u>
	Larveni/Adultni	<u>0.041</u>	0.289	< 0.001	<u>0.014</u>	0.062	< 0.001
	Juvenilni/Adultni	<u>0.022</u>	0.551	<u>0.004</u>	0.114	0.286	<u>0.009</u>
<i>T. karelini</i>	Larveni/Juvenilni	0.401	0.149	<u>0.013</u>	<u>0.027</u>	<u>0.041</u>	< 0.001
	Larveni/Adultni	<u>0.007</u>	<u>0.039</u>	<u>0.002</u>	<u>0.002</u>	<u>0.007</u>	< 0.001
	Juvenilni/Adultni	<u>0.019</u>	0.161	<u>0.047</u>	<u>0.033</u>	0.083	<u>0.047</u>
<i>T. macedonicus</i>	Larveni/Juvenilni	0.088	0.109	0.091	0.192	<u>0.046</u>	0.709
	Larveni/Adultni	<u>0.044</u>	0.241	0.229	0.124	0.066	<u>0.048</u>
	Juvenilni/Adultni	<u>0.189</u>	0.684	0.850	0.243	0.294	<u>0.031</u>

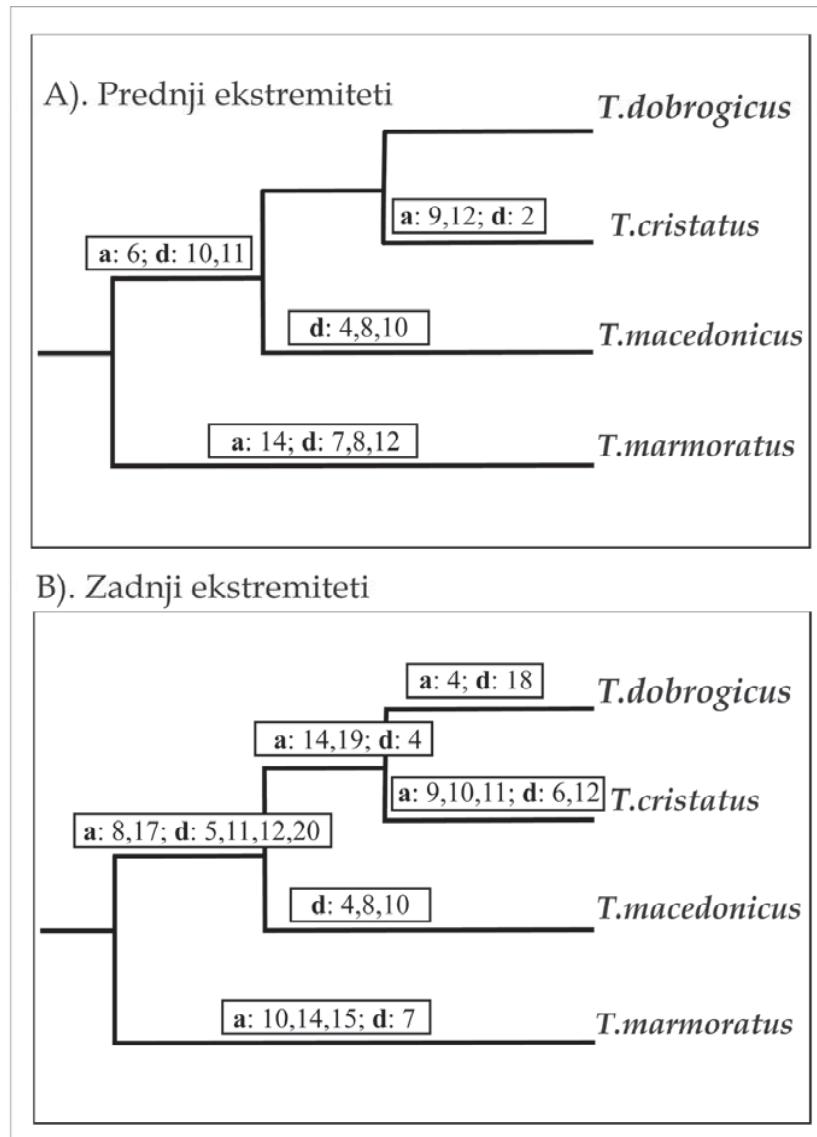
4.4. SEKVENCIJALNA HETEROHRONIJA

4.4.1. PGI ANALIZA

PGI analiza je utvrdila prosečnu dužinu stabla od 30 i 47 koraka za prednje odnosno zadnje ekstremitete.

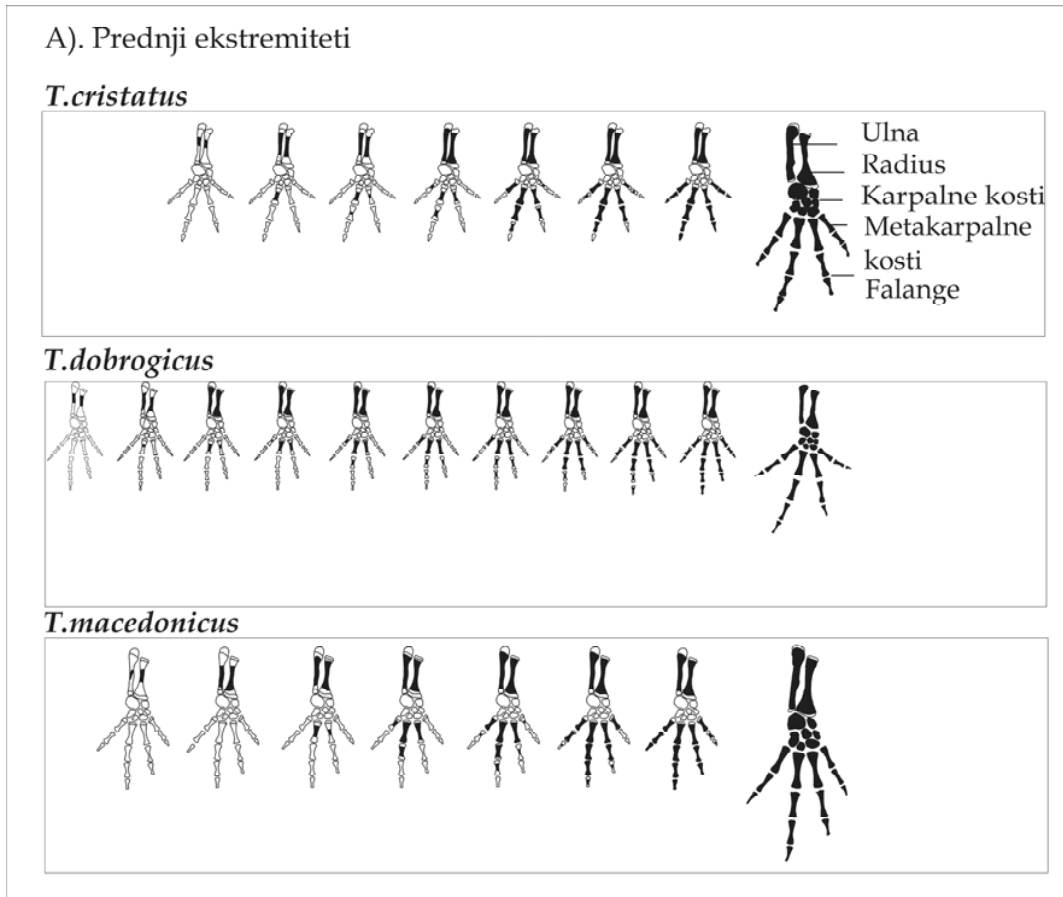
Utvrđena pomeranja u razvojnoj, osifikacionoj sekvenci prednjih ekstremiteta su sledeća (Slika 13.): grana koja vodi ka vrsti *T. marmoratus* je definisana ubrzanjem elementa falange Ph 3.3 i usporavanjem metakarpalnog elemenata 4, i falangi Ph 1.1, Ph 3.1. Svi veliki mrmoljci dele ubrzanje metakarpalnog elementa III (Slika 13.) kao i kasniju osifikaciju elemenata drugog prsta (Ph 2.1 i Ph 2.2). Grana koja vodi ka vrsti *T. macedonicus* se odlikuje usporavanjem u osifikaciji metakarpalnog elementa I, i falangi Ph 1.1 i Ph 2.1. Vrsta *T. cristatus* je definisana ubrzanjem osifikacije elemenata prstiju Ph 1.2 i Ph 3.1 (pogledati Sliku 14. za crteže vezane za redosled događaja u osifikaciji).

Pomeranja u sekvenci osifikacije zadnjih ekstremiteta su prisutna sa većom učestalošću nego kod prednjih ekstremiteta (Slika 13.).



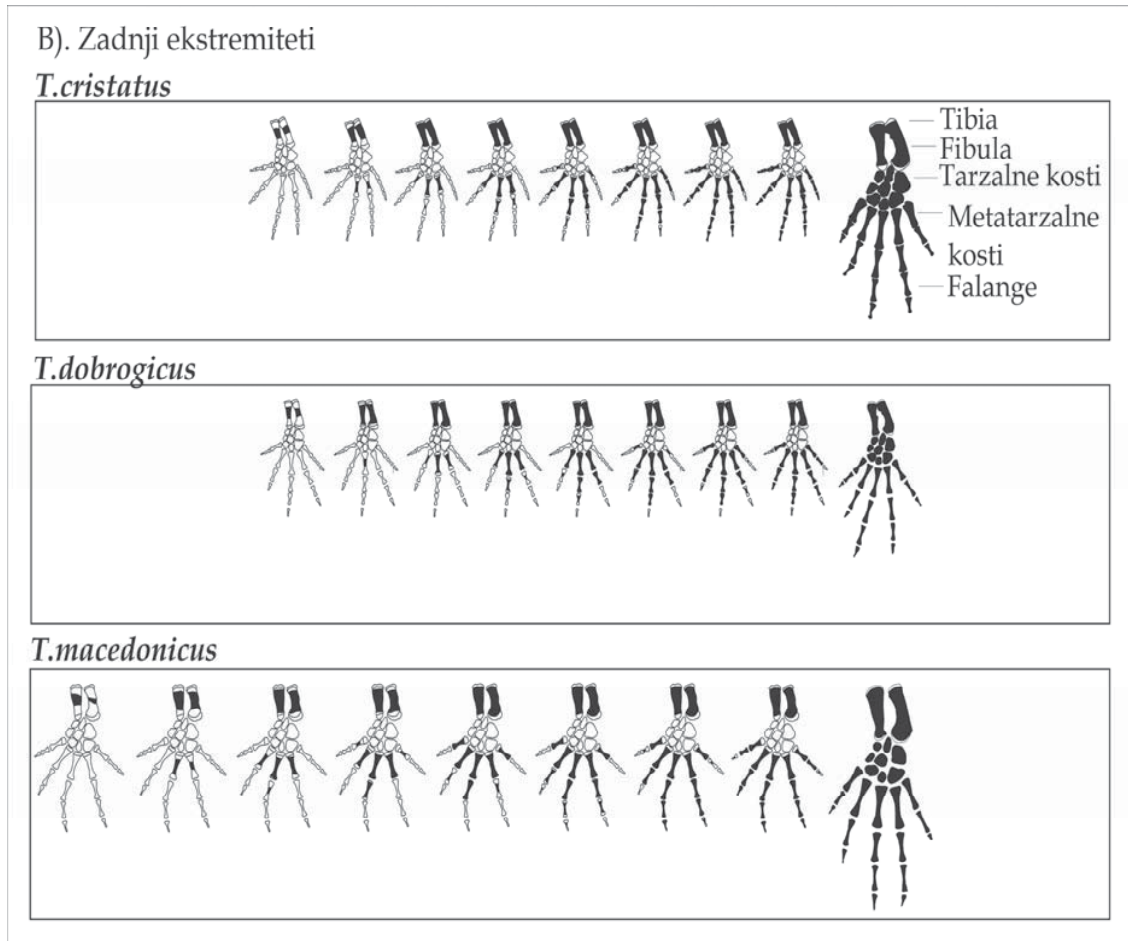
SLIKA 13. Rezultati Pgi analize za prednje i zadnje ekstremitete kod četiri vrsta mrmoljaka. Promene u sekvenci (a: ubrzanja, d: kašnjenja) su mapirane na postojeću prihvaćenu topologiju dobijenu na osnovu mitohondrijalne DNK sekvence (Wielstra i Arntzen, 2011).

Grana koja vodi ka vrsti *T. marmoratus* se odlikuje ubrzanjem osifikacije elemenata prstiju Ph 1.2, Ph 3.2, Ph 3.3, kao i kasnom osifikacijom metatarzalnog elementa IV. Veliki mrmoljci dele ubrzanje osifikacije metatarzalnog elementa V i falange Ph 4.2 kao i usporenje metatarzalnog elementa II, i falangi Ph 5.2 i obe falange drugog prsta (Ph 2.1 i Ph 2.2).



SLIKA 14. Grafičke ilustracije vremenskog rasporeda u osifikaciji elemenata ekstremiteta kod tri vrste velikih krestastih mrmoljaka. A) Prednji ekstremiteti, B) Zadnji ekstremiteti. Veličina crnih polja ukazuje na nivo osifikacije u datom skeletnom elementu. Bela polja označavaju postojanje hrskavičavog tkiva.

Grana koja vodi ka vrsti *T. macedonicus* se odlikuje ubrzanjem osifikacije metatarsalnog elementa V, i falangi Ph 2.1 i Ph 3.3. Kladu koja obuhvata vrste *T. dobrogicus* i *T. cristatus* odlikuje ubrzanje osifikacije falangi Ph 3.2 i Ph 5.1 i kasna osifikacija metatarzalnog elementa I. Grana sa vrstom *T. cristatus* se odlikuje ranom osifikacijom prvog prsta (Ph 1.1 i Ph 1.2) i drugog prsta (Ph 2.1).



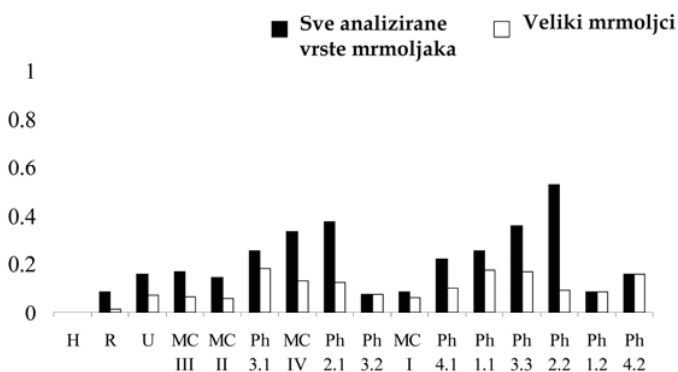
SLIKA 14. Nastavak.

Promene u sekvenci osifikacije u grani koja sadrži vrstu *T. dobrogicus* su prisutne samo u zadnjim ekstremitetima i predstavljaju ubrzanje u osifikaciji metatarzalnog elementa I i usporenje falange Ph 4.3 (pogledati Sliku 14. za skice redosleda osifikacije u zadnjim ekstremitetima analiziranih vrsta mrmoljaka).

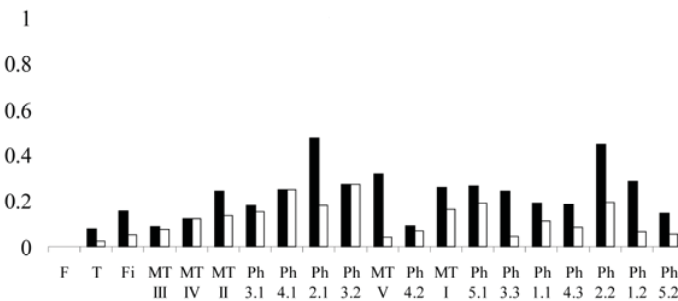
4.4.2. RANK ANALIZA

Rank analiza je utvrdila veliko variranje u osifikacionoj sekvenci, što oslikava razlike u disparitetu osifikacione sekvence krestastih mrmoljaka i mramorastog mrmoljka (Slika 15.).

(a). Prednji ekstremiteti



(b). Zadnji ekstremiteti

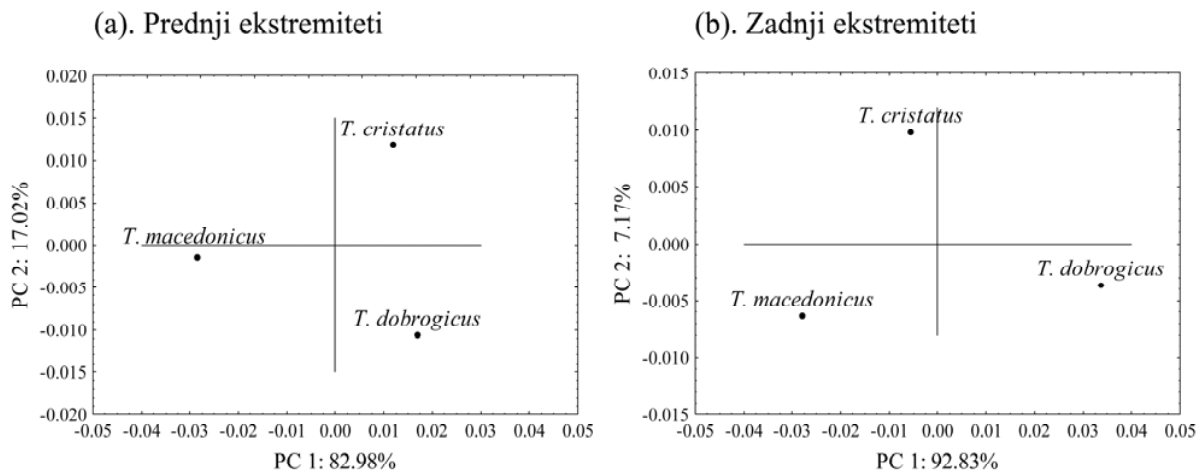


SLIKA 15. Variranje pojedinačnih elemenata u osifikacionoj sekvenci u prednjim i zadnjim ekstremitetima kod velikih krestastih mrmoljaka (beli stubovi) i mramorastog mrmoljka (crni stubovi). a) Prednji ekstremiteti (H-humerus, R-radius, U-ulna, MC-metakarpalni elementi, Ph-falange prstiju); b) Zadnji ekstremiteti (F-femur, T-tibia, Fi-fibula, MT-metatarzalni elementi, Ph-falange prstiju).

Statistički značajna razlika u variranju je utvrđena između mrmoljaka kada su analizirane sve vrste zajedno. Elementi koji su najvarijabilniji u osifikacionoj sekvenci su falange Ph 2.2, Ph 2.1, metakarpalni elementi IV i falange Ph 3.3 u prednjim ekstremitetima i falange Ph 2.1, Ph 2.2, i metatarzalni element V u zadnjim ekstremitetima. Kada su analizirani samo veliki krestasti mrmoljci, elementi koji su više varirali su bili: falange Ph 3.1, Ph 3.3 i Ph 1.1 u prednjim ekstremitetima i falange Ph 3.2 i Ph 4.1 u zadnjim ekstremitetima. Osnovna i najuočljivija razlika u sekvenci osifikacije velikih krestastih mrmoljaka sa jedne strane i mramorastih mrmoljaka sa druge strane, je vezana za poziciju drugog prsta (Ph 2.1 i Ph 2.2) u osifikacionoj sekvenci.

4.5. ALOMETRIJA

Ukupno variranje u alometrijskim odnosima između mrmoljaka je predstavljeno u prostoru definisanom sa prvom i drugom glavnom komponentom (Slika 16.) dobijenom analizom glavnih komponenti, PCA.



SLIKA 16. Alometrijski prostor za tri vrste velikih mrmoljaka. a) Prednji ekstremiteti; b) Zadnji ekstremiteti.

Prva PC osa objašnjava 82.98% variranja u prednjim ekstremitetima, dok druga PC osa objašnjava preostalih 17.02% variranja. U zadnjim ekstremitetima, najveći deo variranja 92.83% je objašnjen prvom osom PC1. Ovaj obrazac variranja prvenstveno oslikava razlike između alometrijskih putanja vrsta *T. macedonicus* i *T. dobrogicus*, dok se položaj vrste *T. cristatus* nalazi između druge dve analizirane vrste.

4.5.1. RAST DO METAMORFOZE

Sve osobine su umereno do srednje korelisane sa veličinom tela (SVL), sa opsegom koeficijenta determinacije od 0.537 do 0.830 (sa izuzetkom za humerus H kod vrste *T. cristatus* i metatarzalnih elemenata MT kod vrste *T. dobrogicus*) (Tabela 10 (A)).

Niske vrednosti koeficijenata determinacije verovatno su vezane za malu veličinu uzorka, posebno u slučaju vrste *T. cristatus*. Putanje elemenata ekstremiteta su se razlikovale u nagibu, sa statističkom značajnošću između vrsta *T. dobrogicus* i *T. macedonicus* ($P < 0.001$ za sve elemente u oba ekstremiteta). Putanje svih elemenata ekstremiteta kod vrsta *T. cristatus* i *T. macedonicus* su delile zajednički nagib i visinu (izuzetak su tibia T i metatarzalni element MT kod kojih je pronađeno statistički značajno pomeranje u visini sa $P < 0.005$), sa značajnim pomeranjem duž zajedničkog nagiba sa $P < 0.001$, sa većim vrednostima za vrstu *T. macedonicus* (Tabela 10 (A). ; Slika 17, 18.).

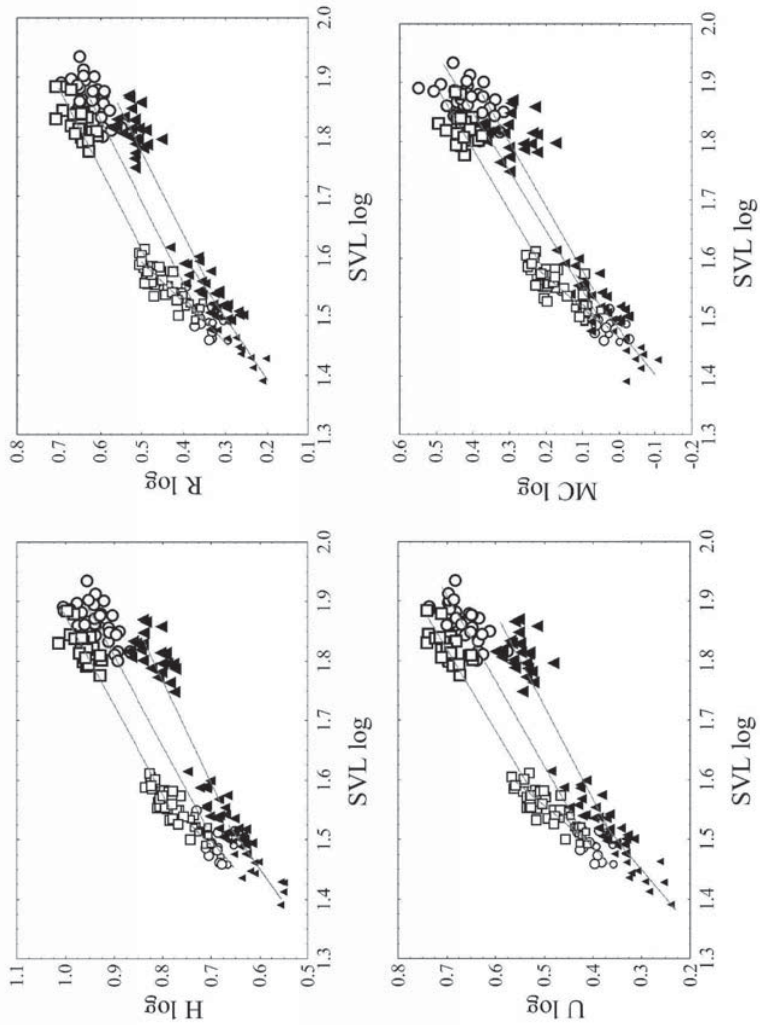
TABELA 10. Alometrijski parametri za tri vrste velikih mrmoljaka, na osnovu modela standardizovanih glavnih osa. a) Rast do metamorfoze ; b). Rast posle metamorfoze; H-humerus, R-radius, U-ulna, MC-metakarpalni element, F-femur, T-tibia, Fi-fibula, MT-metatarzalni element.

(A): RAST DO METAMORFOZE					
Element ekstremiteta	Vrsta	r²	P	Nagib	Intercept
H	<i>T. cristatus</i>	0.335	0.024	0.9593	0.827
	<i>T. dobrogicus</i>	0.814	0.000	1.1493	0.761
	<i>T. macedonicus</i>	0.785	0.000	0.8248	0.821
R	<i>T. cristatus</i>	0.570	0.001	0.7582	1.227
	<i>T. dobrogicus</i>	0.773	0.000	1.0412	1.184
	<i>T. macedonicus</i>	0.746	0.000	0.6731	1.253
U	<i>T. cristatus</i>	0.595	0.001	0.8767	1.136
	<i>T. dobrogicus</i>	0.816	0.000	0.9708	1.159
	<i>T. macedonicus</i>	0.741	0.000	0.6835	1.215
MC	<i>T. cristatus</i>	0.537	0.002	0.5690	1.465
	<i>T. dobrogicus</i>	0.708	0.000	0.7771	1.480
	<i>T. macedonicus</i>	0.645	0.000	0.5444	1.461
F	<i>T. cristatus</i>	0.647	0.000	0.7938	0.977
	<i>T. dobrogicus</i>	0.830	0.000	1.1152	0.805
	<i>T. macedonicus</i>	0.777	0.000	0.7380	1.018
T	<i>T. cristatus</i>	0.699	0.000	0.6635	1.291
	<i>T. dobrogicus</i>	0.776	0.000	0.8222	1.285
	<i>T. macedonicus</i>	0.701	0.000	0.5486	1.345
Fi	<i>T. cristatus</i>	0.672	0.000	0.6583	1.309
	<i>T. dobrogicus</i>	0.772	0.000	0.8554	1.279
	<i>T. macedonicus</i>	0.721	0.000	0.5559	1.351
MT	<i>T. cristatus</i>	0.591	0.001	0.6812	1.370
	<i>T. dobrogicus</i>	0.463	0.000	0.8059	1.386
	<i>T. macedonicus</i>	0.793	0.000	0.5049	1.424

TABELA 10 . Nastavak.

(B): RAST POSLE METAMORFOZE					
Element ekstremiteta	Vrsta	r²	P	Nagib	Intercept
H	<i>T. cristatus</i>	0.941	0.000	1.507	0.452
	<i>T. dobrogicus</i>	0.922	0.000	1.730	0.384
	<i>T. macedonicus</i>	0.968	0.000	1.494	0.381
R	<i>T. cristatus</i>	0.957	0.000	1.373	1.004
	<i>T. dobrogicus</i>	0.922	0.000	1.385	1.081
	<i>T. macedonicus</i>	0.957	0.000	1.356	0.932
U	<i>T. cristatus</i>	0.956	0.000	1.432	0.907
	<i>T. dobrogicus</i>	0.906	0.000	1.565	0.941
	<i>T. macedonicus</i>	0.950	0.000	1.366	0.863
MC	<i>T. cristatus</i>	0.923	0.000	1.015	1.444
	<i>T. dobrogicus</i>	0.842	0.000	0.094	1.470
	<i>T. macedonicus</i>	0.928	0.000	1.060	1.363
F	<i>T. cristatus</i>	0.967	0.000	1.517	0.508
	<i>T. dobrogicus</i>	0.912	0.000	1.743	0.408
	<i>T. macedonicus</i>	0.969	0.000	1.492	0.456
T	<i>T. cristatus</i>	0.979	0.000	1.220	1.113
	<i>T. dobrogicus</i>	0.915	0.000	1.243	1.167
	<i>T. macedonicus</i>	0.963	0.000	1.203	1.076
Fi	<i>T. cristatus</i>	0.978	0.000	1.200	1.148
	<i>T. dobrogicus</i>	0.913	0.000	1.268	1.163
	<i>T. macedonicus</i>	0.954	0.000	1.207	1.096
MT	<i>T. cristatus</i>	0.921	0.000	1.111	1.292
	<i>T. dobrogicus</i>	0.831	0.000	1.025	1.373
	<i>T. macedonicus</i>	0.913	0.000	1.189	1.231

Prednji ekstremiteti

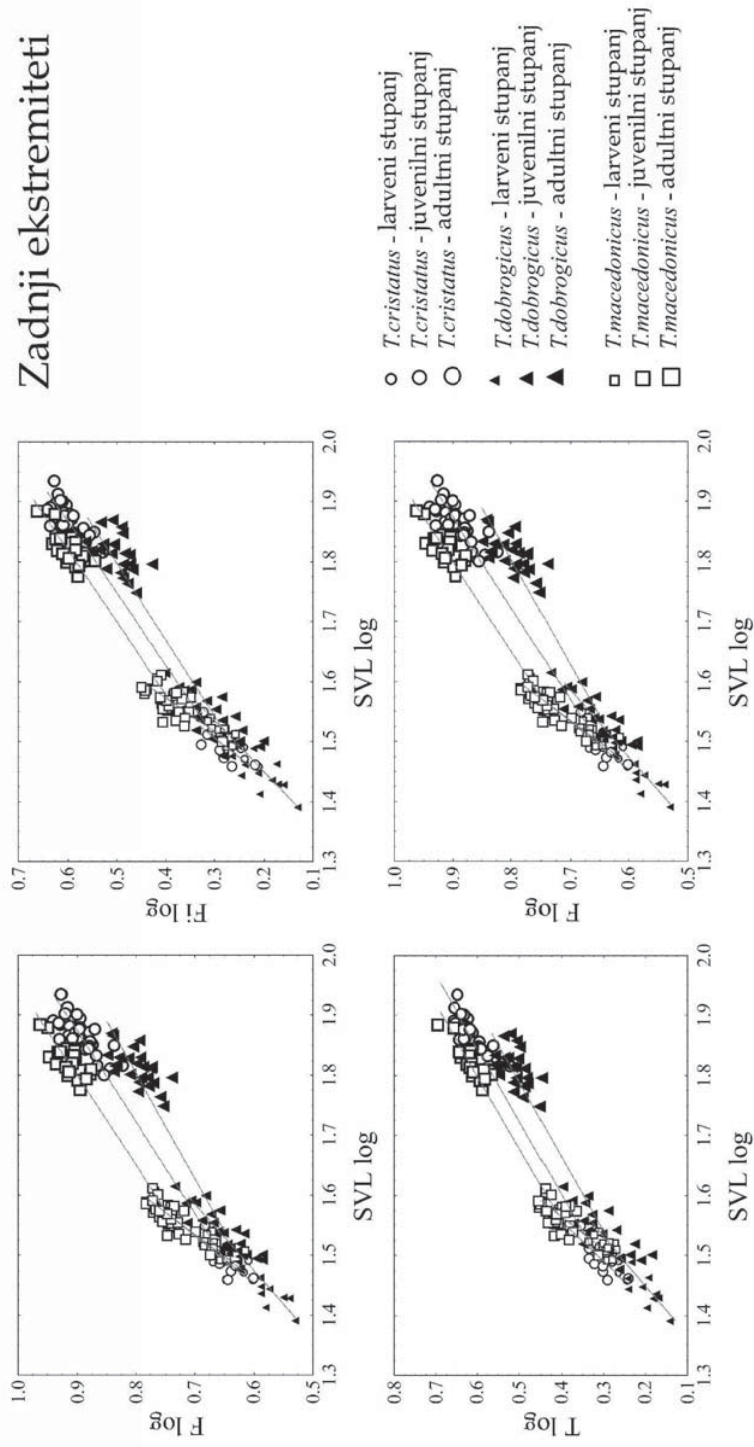


SLIKA 17. Alometrijski odnosi između elemenata prednjih ekstremiteta i dužine tela (logaritamski transformisane vrednosti) za tri vrste velikih mrmoljaka. H-humerus, R-radius, U-ulna, MC-metakarpalni element III, SVL-dužina tela).

4.5.2. RAST POSLE METAMORFOZE

Sve vrste dele zajednički nagib putanja rasta posle metamorfoze, što ukazuje na sličnosti u obrascima rasta (Tabela 10 (B)). Lateralna transpozicija i ontogenetsko skaliranje je uočeno u svim poređenjima ($P < 0.001$), sa većim vrednostima visine kod vrste *T. macedonicus* i većim vrednostima duž zajedničkog nagiba kod vrste *T. cristatus*. Niže vrednosti za visinu i zajednički nagib su karakteristične za vrstu *T. dobrogicus*. Jedinu izuzeci su putanje za elemente humerus H i femur F sa statističkom razlikom u nagibima između vrsta *T. dobrogicus* i druge dve vrste *T. macedonicus* ($P < 0.001$) i *T. cristatus* ($P < 0.001$). Putanje vrsta *T. macedonicus* i *T. cristatus* se razlikuju i u visini i duž zajedničkog nagiba ($P < 0.02$) za elemente ekstremiteta sa većim vrednostima kod vrste *T. cristatus* (Tabela 10 (B). ; Slika 17, 18.).

Zadnji ekstremiteti



Slika 18. Alometrijski odnosi između elemenata zadnjih ekstremiteta i dužine tela (logaritamski transformisane vrednosti) za tri vrste velikih mrmoljaka. F-femur, T-tibia, Fi-fibula, MT-metatarzalni element III, SVL-dužina tela).

5.DISKUSIJA

5.1. VARIJABILNOST U OBRASCIMA ORGANIZACIJE KARPUSA I TARZUSA

Obrasci variranja utvrđeni u ovoj studiji ukazuju da je variranje basipodijuma kod velikih krestastih mrmoljaka u skladu sa opisanim obrascima variranja kod drugih vrsta repatih vodozemaca (Caudata) (Shubin i Wake, 2003), kao i sa prethodno analiziranom varijabilnošću basipodijuma kod vrsta *T. carnifex* (Zaffaroni i sar., 1999). Varijabilni obrasci basipodijuma kod analiziranih vrsta su takođe prisutni kao česte varijante u analizama varijabilnosti drugih vrsta porodice Salamandridae (*Triturus cristatus*, *T. marmoratus*, *Taricha granulosa*) (Rienesl i Wagner, 1992; Shubin i sar., 1995). Analiza varijabilnosti mesopodialnih obrazaca pokazuje prisustvo atavizma koji dovodi do ponovne ekspresije određenih varijanti na različitim hijerarhijskim nivoima filogenije repatih vodozemaca, pa tako česte varijante izvedenih grupa su upravo standardne varijante bazalnih grupa (Shubin i Wake, 1996). Kod vrsta roda *Triturus*, standardna varijanta tarzusa je fuzija elemenata distalnih tarzalnih elemenata 4 i 5, dok se kao normalno variranje pojavljuje predačko stanje koje podrazumeva prisustvo dva odvojena elementa. Međutim, ovo variranje je najverovatnije limitirano razvojnim sistemom, pa se diverzifikacija ekstremiteta odlikuje fiksiranjem onih obrazaca koji su prisutni kao varijabilni deo filogenetski bliskih taksona.

Značajan rezultat ove studije je podatak da je u basipodijumu vrste *T. dobrogicus* došlo do gubitka jednog od karpalnih elemenata (centrale 1), što može da bude rezultat zadržavanja embrionskih odlika kod adultnih jedinki (Shubin i Alberch, 1986; Shubin, 2002). Uopšte, tendencije u evoluciji ekstremiteta kod repatih vodozemaca su usmerene na redukciju broja koštanih elemenata. Tako kod mnogih vrsta odsustvuju neki karpalni elementi, sa ekstremnim oblikom kod roda *Proteus* čiji karpus je izgrađen iz samo 3 elementa (Shubin i Wake, 1996). Redukcija se često povezuje sa pedomorfozom. Specifičnost ekstremiteta dunavskog mrmoljka (*T. dobrogicus*) se dopunjuje i posebnim planom organizacije karpusa i tarzusa koji odlikuje nizak nivo

osifikacije praćen rastresitim pakovanjem elemenata-kostiju (Ivanović i sar., 2008b). Na osnovu dobijenih rezultata pretpostavljeno je da heterohronična promena može biti neposredan mehanizam morfoloških promena kod vrste *T. dobrogicus* (Ivanović i sar., 2008b).

Opažena varijabilnost u morfologiji ekstremiteta koja uključuje različit nivo osifikacije i „gustinu pakovanja“ elemenata karpusa i tarzusa, mogu ukazati na mogućnost njihove veze sa razlikama u pogledu adaptacija na specifične uslove životne sredine. Pošto mrmoljci imaju bifazični životni ciklus sa larvama i adultnim jedinkama, koji u vreme parenja naseljavaju vodenu sredinu i juvenilnim i adultnim jedinkama van sezone parenja, koji naseljavaju terestričnu sredinu, oni koriste i akvatično i terestrično kretanje. Analizirane četiri vrste mrmoljaka se znatno razlikuju u pogledu preferenci ka akvatičnim/terestričnim staništima. Vrsta koja spada u grupu više akvatičnih mrmoljaka je vrsta *T. dobrogicus* sa prosečno šest meseci provedenih u vodenoj sredini godišnje. Ostale vrste provode prosečno manje vremena u akvatičnoj sredini i to: pet meseci vrsta *T. cristatus*, četiri meseca vrsta *T. carnifex* i samo tri meseca vrsta *T. karelinii* koja predstavlja i najterestričniju vrstu u ovoj grupi vrsta (Andreone i Giacom, 1989; Arntzen, 2003). Dunavski mrmoljak je, u poređenju sa drugim vrstama mrmoljaka, isključivo vezan u rasprostranjenju na relativno velika otvorena vodena staništa (kao na primer močvare ili kanali sa sporo tekućom vodom). Sa druge strane, vrste *T. carnifex* i *T. karelinii*, su uglavnom stanovnici bara koji provode reproduktivni period u malim lentičnim barama i često na većim nadmorskim visinama. Dobro osifikovan karpus i tarzus kao i duži ekstremiteti posebno početni/proksimalni elementi, koji moraju da izdrže težinu tela na kopnu, mogu se smatrati adaptacijama ovih mrmoljaka na mehaničke zahteve terestrične lokomocije (Ivanović i sar., 2008b). Najakvatičnija vrsta *T. dobrogicus* ima kratke ekstremitete i niži nivo osifikacije u basipodijumu (Ivanović i sar., 2008b). Vitko izduženo telo i redukovani ekstremiteti kod ove vrste mogu favorizovati sposobnosti plivanja-bočnim

savijanjem tela, dok su robusno i kraće telo sa dužim ekstremitetima adaptacije za terestričnu lokomociju, jer duži ekstremiteti omogućavaju duži iskorak i samim tim efikasnije kretanje po tlu (Arntzen i Wallis, 1999; Arntzen i sar., 2007). Međutim, kod grupa sa složenim životnim ciklusom, koji obuhvata život i u vodenoj i u kopnenoj sredini, moguće je postojanje uzajamnih ograničenja između lokomocija u dve sredine. Kod mrmoljaka se može očekivati kompromisni fenotip koji ne maksimizira ni jednu lokomociju. U studiji sa deset vrsta evropskih mrmoljaka, uključujući i velike krestaste mrmoljke, je utvrđeno da je izduživanje tela praćeno smanjenjem brzine kretanja kretanja po kopnu, ali takođe i smanjenjem brzine plivanja što ukazuje na postojanje uzajamnog ograničavanja između akvatične i terestrične lokomocije kod ovih mrmoljaka (Gvoždik i Van Damme, 2006).

Bez obzira na postojanje uzajamnog ograničavanja, evolucija ekstremiteta velikih krestastih mrmoljaka bi mogla biti povezana sa njihovom ekološkom diverzifikacijom (Ivanović i sar., 2008b). Primer je *dobrogicus* klada koja je naselila nizijska velika otvorena vodena staništa Panonije i Dobrogee, i prilagodila se mnogo većem akvatičnom životu u odnosu na ostale vrste velikih mrmoljaka (Crnobrnja-Isailović i sar., 1997; Arntzen i sar., 2007). Ta promena je bila toliko izražena da se može reći da vrsta *T. dobrogicus* ima potpuno drugačiju ekološku nišu od ostalih vrsta velikih krestastih mrmoljaka (Arntzen i Wallis, 1999).

5.2. MORFOLOŠKA INTEGRACIJA I MODULARNOST

Jedan od osnovnih ciljeva ove studije bio je istraživanje varijabilnosti skeletnih elemenata tokom ontogenije i filogenije velikih mrmoljaka. Akcenat je postavljen na mogući uticaj procesa metamorfoze i ontogenetske promene niše, na nivo i obrasce morfološke integracije. Iako mala veličina uzorka, posebno za larveni stupanj, limitira direktnu evaluaciju morfološke integracije tokom

ontogenije i promene obrazaca integracije, dobijeni rezultati ukazuju na postojanje dva osnovna pravca variranja (Tomašević Kolarov i sar., 2011). Prvi pravac variranja podrazumeva da su odgovarajući ontogenetski stupnjevi sličniji između vrsta nego sukcesivni ontogenetski stupnjevi u okviru jedne iste vrste, sa najvećim nivoom integracije u juvenilnom stupnju. Drugi pravac variranja ukazuje na razlike u obrascima integracije između više akvatičnih i više terestričnih vrsta mrmoljaka. Naime, niže korelacije između homologih elemenata ekstremiteta praćene su povećanjem korelacija između elemenata unutar ekstremiteta terestričnih vrsta velikih mrmoljaka (kao *T. karelinii*), dok više akvatične vrste (kao *T. dobrogicus*) imaju suprotan obrazac variranja sa većim korelacijama između homologih elemenata ekstremiteta nego između elemenata unutar ekstremiteta (Tomašević Kolarov i sar., 2011).

Ovi rezultati su u jasnoj suprotnosti sa rezultatima dobijenim u drugim studijama ontogenetske integracije, poput studija integracije skapule primata (Young, 2006) ili lobanje hominida (Ackermann, 2005), kod kojih je utvrđeno da su obrasci kovariranja generalno mnogo sličniji između ontogenetskih stupnjeva za bilo koju vrstu nego između vrsta za bilo koji stupanj u toku ontogenije. Takođe, ovi rezultati se izdvajaju i u pogledu obrazaca integracije u ekstremitetima u odnosu na grupe kao što su primati (Young i sar., 2010), gde je utvrđeno da različite grupe dele razvojno ograničene obrasce integracije, kod kojih homologni elementi prednjih i zadnjih ekstremiteta imaju veću korelaciju u poređenju sa nehomologim elementima.

Veća integracija u juvenilnom stupnju je dobijena u studijama integracije ekstremiteta kod ptica (Cane, 1993), kao i u ekstremitetima pacova (Zelditch, 1988), iako je utvrđeno da u slučajevima gde postoji dovoljno podataka integracija fluktuirá tokom postnatalnog perioda (Zelditch, 1988). Ovi podaci dovode do zaključka da visok nivo integracije prisutan u juvenilnom stupnju predstavlja funkciju brzog, koordinisanog rasta skeleta ekstremiteta tokom perioda u okviru koga sistemski hormoni imaju odlučujuću ulogu.

Visok nivo integracije kod juvenilnih jedinki je utvrđen i u slučaju lobanje (Willmore i sar., 2006; Goswami i Polly, 2010). Kranijalna integracija kod juvenilnih miševa (Willmore i sar., 2006) i japanskih makaka majmuna (Goswami i Polly, 2010) je najveća u najmlađim uzrasnim klasama. Međutim, obrasci integracije i njihova "uočljivost i doslednost" zavise od izbora taksona, uzrasne klase, kao i anatomskog regiona. Veća integracija kranijuma kod adultnih nego juvenilnih jedinki je utvrđena kod nekih vrsta sisara i mrmoljaka (Ackermann, 2005; Ivanović i sar., 2005), kao i u slučaju oblika tela kod riba (Fischer-Rousseau i sar., 2009). Nedostatak "doslednog obrasca" između, i u okviru osnovnih grupa tetrapoda, pokazuje da totalna integracija, merena preko obrazaca morfološkog kovariranja, predstavlja rezultat mnogih lokalnih kao i globalnih-sistemskih faktora koji menjaju jedan drugome efekat u vremenu i prostoru (*palimpsest model*: Hallgrímsson i sar., 2009). Stoga su opaženi obrasci integracije specifični i zavisni kako od izbora vrste-taksona, tako i od njegove životne istorije.

Razlike u obrascima integracije između velikih mrmoljaka i grupa sa više kontinuiranim razvićem, kao što su sisari, mogu biti povezane sa razvojnim i funkcionalnim karakteristikama koje su specifične za repate vodozemce. Kod repatih vodozemaca, postoji razlika u relativnom vremenu pojave prednjih i zadnjih ekstremiteta. Kod vrsta roda *Triturus*, prednji ekstremiteti se pojavljuju prvi i imaju ubrzani razvoj u odnosu na zadnje ekstremitete. Prednji ekstremiteti postaju hrskavičavi pre nego što se uopšte formira začetak zadnjih ekstremiteta (Duellman i Trueb, 1994; Bininda-Emonds i sar., 2007). Takođe, ekstremiteti imaju i različite biološke uloge tokom života jedinki: zadnji ekstremiteti ženki imaju dodatnu ulogu u reprodukciji kao što je pakovanje i umotavanje jaja u lišće podvodnih biljaka, dok zadnji ekstremiteti mužjaka imaju važnu ulogu u održavanju specifičnih položaja tela pri udvaranju tj. svadbenim igrama (Griffiths, 1996). Zbog razlika kao što su razlike u vremenu pojave i različite biološke uloge prednjih i zadnjih ekstremiteta kod repatih vodozemaca, može se očekivati disocijacija ili razdvajanje između serijalno i

funkcionalno homologih elemenata ekstremiteta. Takođe, prethodne studije varijabilnosti u basipodijumu kod velikih mrmoljaka su pokazale veći nivo intraspecifične varijabilnosti u karpusu nego u tarzusu (Rienesl i Wagner, 1992; Ivanović i sar., 2008b), što može ukazati na različite selekzione pritiske koji postoje na prednjim i zadnjim ekstremitetima.

Iako se ekstremiteti razvijaju ujednačeno tokom ontogenije mrmoljaka (tačnije, ekstremiteti ne prolaze kroz drastične promene tokom metamorfoze kao što je to slučaj sa glavenim skeletom), rezultati ove studije su pokazali da se korelaciona struktura između larvenog i juvenilnog stupnja značajno razlikuje. Ove razlike su verovatno nastale usled različitih funkcionalnih zahteva (Tomašević Kolarov i sar., 2011). Na stupnju larve kretanje je ostvareno pretežno bočnim pokretima tela i repa i obuhvata: hodanje po dnu bare, pasivno plutanje ili kretanje pomoću kratkih pokreta repa. Kada juvenilne jedinke napuste vodenu sredinu, njihovi ekstremiteti moraju biti u stanju da izdrže težinu tela i da efektivno obavljaju terestričnu lokomociju. Suvozemno kretanje zahteva dosta energije i ostvaruje se sinhroničnim korišćenjem dijagonalno postavljenih ekstremiteta. Ekstremiteti na taj način moraju da izdrže težinu tela i da omoguće kretanje ka napred. U vodenoj sredini, kretanje metamorfoziranih jedinki (juvenilnih i adultnih jedinki) se postiže pretežno pokretima repa dok se ekstremiteti drže što bliže telu da bi se smanjio hidrodinamičan otpor tela u vodenoj sredini (Azizi i Horton, 2004). Iz ovoga sledi da upravo funkcionalni zahtevi različitih sredina i lokomocije u njima mogu imati najveći uticaj na obrasce morfološke integracije (Young i Hallgrimsson, 2005) kod velikih mrmoljaka tokom ontogenije (Tomašević Kolarov i sar., 2011). Podudaranje između funkcije i obrazaca morfološke integracije može se postići koordinisanim evolucionim promenama u genetičkim korelacijama i razvojnim programima, što bi imalo za cilj podudaranje genetičkih i razvojnih modula sa funkcionalnim modulima (Cheverud, 1982; Wagner i Altenberg, 1996; Klingenberg i sar., 2010; Young i sar., 2010). Međutim, pošto se ekstremiteti mrmoljaka razvijaju rano tokom

razvića, a uporedo se koriste za kretanje, podložni su uticajima epigenetičkih faktora, kao što su neuro-mišićna koordinacija ili interakcija između kosti i mišića (Young i sar., 2009), koji mogu da utiču na promenu obrazaca kovariranja.

Opaženi obrasci korelacija daju informacije o procesima koji su doveli do evolucione raznovrsnosti u morfološkoj integraciji kod grupa organizama sa diskontinuiranim, bifazičnim razvićem. Tranzicija u ontogeniji velikih mrmoljaka (metamorfoza i ontogenetska promena niše sa diferencijalnim načinima kretanja) je najverovatnije povezana sa promenama u korelacionoj strukturi. Funkcija je verovatno faktor koji utiče obrasce morfološke integracije u ekstremitetima velikih krestastih mrmoljaka (Tomašević Kolarov i sar., 2011). Dobijeni rezultati takođe ukazuju da je redukcija korelacije između homologih elemenata ekstremiteta i povećanje korelacije između elemenata unutar ekstremiteta najverovatnije predačko stanje kod mrmoljaka. Dostupni podaci ukazuju da je morfološka integracija evoluciono labilna kod velikih mrmoljaka, i da se tranzicija od predačkog i izvedenog obrasca ponavljala više puta, najverovatnije vođena sredinskim zahtevima.

5.3. HETEROHRONIJA

Drugi osnovni cilj ove studije bio je istraživanje efekta heterohroničnih promena na variranje ekstremiteta kod velikih mrmoljaka. Analiza kod tri vrste krestastih mrmoljaka je ukazala na važan uticaj heterohronije u ranom periodu pre metamorfoze (Tomašević Kolarov, 2013).

5.3.1. SEKVENCIJALNA HETEROHRONIJA

Uporedna analiza osifikacionih sekvenci ekstremiteta velikih mrmoljaka utvrdila je postojanje nekoliko sinapomorfni heterohroničnih promena, koje uključuju kašnjenje u sekvenci drugog prsta i ubrzanje metakarpalnog elementa

III i metatarzalnog elementa V (Tomašević Kolarov, 2013). Ove heterohronične promene su važne za razmatranje morfološke evolucije ekstremiteta kod velikih krestastih mrmoljaka jer uključuju promenu preaksijalne ka postaksijalnoj dominaciji u razvojnoj sekvenci, koja nije poznata kod repatih vodozemaca (Shubin i Wake, 2003; Frobisch, 2008; Frobisch i Shubin, 2011). Tačnije, osnovne karakteristike razvića ekstremiteta kod repatih vodozemaca uključuju preaksijalnu dominaciju u osifikacionoj sekvenci (Frobisch, 2008). Iako postoji izvesno variranje u osifikacionoj sekvenci, generalni obrazac uključuje započinjanje osifikacije u drugom prstu i to metapodijalnim i falangialnim elementima, što je praćeno osifikacijom u prstima III, I, IV i V (Frobisch, 2008). Kod svih vrsta velikih krestastih mrmoljaka koje su analizirane u ovoj studiji, obrazac osifikacije u autopodijumu započinje sa prstom III i u metapodijalnim i falangialnim elementima, što je u suprotnosti sa podacima za ostale vrste repatih vodozemaca, koje se odlikuju ranim razvojem drugog prsta (Frobisch, 2008; Frobisch i Shubin, 2011). Kašnjenje u osifikaciji drugog prsta je praćeno promenom pravca razvića ekstremiteta u smeru postaksijalne dominacije što ukazuje na drastične promene u razvojnom obrascu unutar klade (Tomašević Kolarov, 2013). Ova promena može potencijalno uključiti promene i u procesu hondrifikacije i osifikacije, ili je promena specifična samo za osifikacionu sekvencu. Osifikaciona sekvenca je u određenoj meri korelisana sa prethodnim razvojnim procesima. Podudaranje u sekvenci hondrifikacije i osifikacije zavisi od analiziranog taksona. Frobisch (2008) je na osnovu analize sekvenci hondrifikacije i osifikacije došla do rezultata koji govore o postojanju jače korelacije između sekvenci kod anamniota nego kod amniota. Odvajanje ovih sekvenci se može pripisati funkcionalnim zahtevima koji imaju jak uticaj na obrazac osifikacije. Analiza sekvence hondrifikacije u ekstremitetima velikih mrmoljaka bi bila u tom aspektu jako zanimljiva.

Preaksijalna polarnost u razviću prstiju kod repatih vodozemaca se smatra larvenom adaptacijom, kao što je pretpostavio Schmalhausen (1910). U ovom kontekstu, mora se istaći da kašnjenje u osifikaciji drugog prsta i

postaksijalna dominacija kod velikih krestastih mrmoljaka, se ne može objasniti kao adaptivna, pošto mramorasti mrmoljci, kao sestrinska grupa, u potpunosti nalikuju krestastim mrmoljcima u mnogim aspektima njihove morfologije i biologije (Arntzen i Sparreboom, 1989).

Promene u sekvenci kod krestastih mrmoljaka gledano u odnosu na vrstu *T. marmoratus* se mogu objasniti evolucionom istorijom grupe. Snažna filogenetska kanalisiranost razvića je odgovorna za stabilnost razvojnih putanja kod blisko srodnih vrsta (Grünbaum i sar., 2003). Koncept evolucionih ograničenja uzima u obzir filogenetsku istoriju u proceni razlika između taksona, jer opažene razlike mogu biti jednostavno rezultat istorijskih promena (Sanger, 2008). Vremensko razdoblje radijacije velikih krestastih mrmoljaka odgovara periodu povećanja sezonalnosti u Evroaziji tokom kasnog Miocena (11.6-5.3 Ma) (Wielstra i Arntzen, 2011). Heterogena sredina u pogledu vlažnosti, može da promovise reproduktivnu izolaciju i specijaciju, posebno uzimajući u obzir fundamentalnu ulogu koju vodena staništa imaju u reprodukciji vodozemaca (Wielstra i Arntzen, 2011; Ivanović i sar., 2012). Upravo takvi uslovi mogu da dovedu do promena u sekvenci osifikacije koje nisu pod delovanjem selekcije. Jer, kao što je primećeno, kolonizirajuće populacije su posebno sklone divergenciji, zbog svoje veličine, pa su genetičke promene češće (Ivanović i Kalezić, 2012). Filogenetske implikacije se poklapaju sa promenama u variranju položaja elementa u sekvenci ili variranju rangova pojedinačnih elemenata ekstremiteta. Veliki krestasti mrmoljci se odlikuju nižim variranjem pojedinačnih elemenata u sekvenci nego kada se analizira variranje elemenata kod velikih mrmoljaka zajedno (Tomašević Kolarov, 2013). Specifične promene u osifikacionoj sekvenci praćene niskim nivoom variranja položaja pojedinačnih elemenata u sekvenci, ukazuju na složene promene u obrascima razvića ekstremiteta kod velikih krestastih mrmoljaka, posmatranih u odnosu na sestrinsku vrstu *T. marmoratus* (Tomašević Kolarov, 2013).

Analiza osifikacionih sekvenci kod velikih mrmoljaka je utvrdila česte promene u rasporedu/redosledu razvojnih događaja (Tomašević Kolarov, 2013).

Ove promene su povezane sa promenama u autopodijumu, i to posebno falangealnim elementima. Kao što su ukazali Shubin i Wake (2003), najveće promene u razviću ekstremiteta kod repatih vodozemaca nastaju usled razlika u vremenu pojave prednjih i zadnjih ekstremiteta, kao i usled razlika u formiranju prstiju. Ove razlike se povezuju sa reproduktivnom ekologijom ili larvenom biologijom vrsta. Repati vodozemci se razlikuju u biologiji i životnoj istoriji, pre svega larvenog stupnja. Naime, kod nekih vrsta larve se razvijaju u barama, kod nekih drugih u brzacima, dok postoje i vrste sa direktnim razvićem (Shubin i Wake, 2003; Vorobyeva, 2009). Jaja velikih mrmoljaka se razvijaju u akvatičnoj sredini, u manje ili više stalnim vodenim staništima. Larve se izvaljuju i aktivno se kreću u vodenoj sredini, koristeći ekstremitete koji nisu u potpunosti razvijeni. Sve vrste mrmoljaka koji su analizirani u ovoj studiji imaju sličnu biologiju larvenog stupnja i sličnu životnu istoriju i ekologiju, pa tako razlike u osifikacionoj sekvenci između vrsta verovatno nisu nastale usled različitih adaptacija na specifične larvene uslove sredine (Tomašević Kolarov, 2013). Vorobyeva i Mednikov (2004) su pokazali da redosled osifikacije elemenata ekstremiteta nije povezan sa kretanjem larvi kod vrsta *Salamandrela keyserlingii*, *Ommatotriton vittatus* i *Lissotriton vulgaris*, sa velikom individualnom varijabilnošću u osifikacionoj sekvenci prisutnoj kod ovih vrsta (Vorobyeva i Mednikov, 2004, 2007). Vorobyeva i Mednikov (2004) su dali hipotezu da je za larve u pogledu korišćenja ekstremiteta za kretanje jedino brza osifikacija pojedinačnih, celih prstiju važna. Prema toj hipotezi prirodna selekcija ne može da uspostavi strogi redosled osifikacije falangi prstiju.

Funkcionalni i ekološki zahtevi mogu takođe voditi ka promenama u redosledu razvojnih procesa (Klingenberg, 2010; Bickelmann i sar., 2012). Mnoge studije o razvojnim procesima u ekstremitetima su utvrdile postojanje promena sa potencijalnim adaptivnim značajem (Richardson i sar., 2009; Sears, 2009; Bickelmann i sar., 2012). U studiji na ekstremitetima kod guštera familije Scincidae, Hugi i sar. (2012) su pokazali da su heterohronične promene u

osifikacionoj sekvenci povezane sa promenama u tipu kretanja, kao i sa adaptacijom na različite sredinske uslove. Kod velikih mrmoljaka sekvencijalne heterohronične promene dobijene na osnovu PGI analize ne mogu se povezati ni sa tipom kretanja, ni sa tipom staništa (akvatična/terestrična) (Tomašević Kolarov, 2013). Buduće analize koje bi obuhvatile veći uzorak klade mogu dati uvid o uticaju ekoloških faktora i promena u osifikacionoj sekvenci kod mrmoljaka i repatih vodozemaca.

5.3.2. HETEROHRONIJA RASTA – ALOMETRIJSKA HETEROHRONIJA

Analiza alometrijskih obrazaca variranja ekstremiteta velikih krestastih mrmoljaka pokazala je postojanje zajedničkih promena karakterističnih za sve vrste mrmoljaka, kao i promena koje su specifične samo za pojedine vrste. Dva važna rezultata su uočena: osobenosti obrazaca rasta kod vrste *T. dobrogicus*, kao i zajednički obrazac rasta nakon završene metamorfoze kod svih vrsta velikih krestastih mrmoljaka (Tomašević Kolarov, 2013).

Rezultati su pokazali da variranje u dužinama ekstremiteta nastaje promenama tokom larvenog perioda razvića. Razlike u dužini ekstremiteta su prisutne tokom metamorfoze posle koje sledi ujednačen i paralelan rast svih elemenata ekstremiteta relativan u odnosu na dužinu tela kod različitih vrsta. Analiza larvenog rasta je pokazala da razlike u ekstremitetima između vrsta nastaju tokom ranih stupnjeva razvića ekstremiteta. Specifični morfotip kod vrste *T. dobrogicus* se odlikuje različitom stopom rasta u odnosu na druge vrste mrmoljaka, dok je variranje kod adultnih jedinki vrsta *T. cristatus* i *T. macedonicus* nastalo tokom ranijih faza u razviću ekstremiteta. Ovi rezultati ukazuju na verovatni uticaj i ulogu kako prirodne selekcije tako i unutrašnjih-razvojnih mehanizama koji regulišu variranje dužine ekstremiteta tokom diverzifikacije velikih mrmoljaka (Tomašević Kolarov, 2013).

Iako se za srodne/filogenetski bliske vrste očekuje da imaju slične razvojne putanje, zbog zajedničkih genetičkih i razvojnih programa (Wilson i

Sanchez-Villagra, 2009; Klingenberg, 2010), naseljavanje novih staništa može uticati na brzu divergenciju i može imati važnu ulogu u specijaciji (Orr i Smith, 1998). Heterohronija se često poklapa sa promenama u životnim istorijama, jer te promene izlažu organizam drugačijim selekcionim pritiscima (Hanken, 1992; Ryan i Semlitsch, 2003; Denoel i sar., 2005; Weisbecker i sar., 2008). Najveće odstupanje od predačke forme ekstremiteta je prisutno kod vrste *T. dobrogicus*. Adaptacije dunavskog mrmolja na akvatična staništa uključuju izduživanje tela i skraćivanje ekstremiteta, veliki broj pršljena koji nose rebra, i nizak nivo osifikacije basipodijuma (Ivanović i sar., 2008b). Kod različitih grupa kičmenjaka, evolucija tela u pravcu njegovog izduživanja, je često praćena smanjenjem u dužini ekstremiteta (Wiens i Slingluff, 2001). Međutim, treba istaći da prednost izduživanja tela kod velikih mrmolja sa više akvatičnim načinom života nije statistički značajno povezana sa povećanjem u brzini plivanja (Gvoždik i Van Damme, 2006). Brzina plivanja ne mora da bude prednost u staništima koje naseljava ova vrsta; izduženo telo sa malim ekstremitetima može biti prednost pri kretanju u muljevitom vodenom staništu sa velikim brojem biljaka. Buduća istraživanja će dati više informacija o prednostima specifičnog morfotipa kod dunavskog mrmolja.

Piras i sar. (2011) su takođe pokazali da heterohronični procesi mogu biti mehanizam koji vodi ka brzom radijaciji/fenotipskoj raznovrsnosti kod guštera roda *Podarcis*. Bez obzira na ograničene razvojne putanje, mala heterohronična promena preko ontogenetskog pomeranja može dovesti do formiranja funkcionalne i ekološki značajne fenotipske varijabilnosti.

Ova studija je analizirala uticaj sekvencijalne heterohronije i alometrijske heterohronije na varijabilnost ekstremiteta kod velikih krestastih mrmolja. Analiza osifikacione sekvence je utvrdila neke sinapomorfne heterohronične promene specifične za grupu velikih krestastih mrmolja, iako bez adaptivnog značaja. Alometrijske putanje analiziranih vrsta velikih mrmolja su pokazale velike sličnosti u rastu posle metamorfoze, dok su odlike rasta do metamorfoze

ukazale na specifičnosti vezane verovatno sa ekološkim i funkcionalnim osobenostima različitih vrsta velikih mrmoljaka.

6. ZAKLJUČCI

1. U okviru obrazaca variranja u basipodijumu koji su u skladu sa opisanim obrascima variranja kod drugih vrsta repatih vodozemaca, prisustvo samo određenih varijanti i obrazaca, kao i sličnosti prisutnih varijanti sa variranjem kod drugih populacija i filogenetski bliskih grupa, ukazuje na postojanje ograničenja u nastanku varijabilnosti bazipodijuma kod velikih krestastih mrmoljaka.
2. Značajan podatak ove studije je da je u basipodijumu vrste *T. dobrogicus* došlo do gubitka jednog od karpalnih elemenata (centrale 1). Specifičnost ekstremiteta dunavskog mrmoljka se dopunjuje i posebnim planom organizacije karpusa i tarzusa koji odlikuje nizak nivo osifikacije praćen rastresitim pakovanjem skeletnih lemenata. Sve ove odlike ukazuju na postojanje heterohronične promene (pedomorfoze) kada je u pitanju skelet ekstremiteta.
3. Opažena morfologija ekstremiteta koja uključuje različit nivo osifikacije i gustinu pakovanja elemenata karpusa i tarzusa, ukazuje i na moguće razlike u pogledu adaptacija na specifične uslove životne sredine (akvatična-terestrična).
4. Analiza morfološke integracije i modularnosti je utvrdila postojanje dva važna aspekta variranja elemenata ekstremiteta velikih krestastih mrmoljaka. Odgovarajući ontogenetski stupnjevi su sličniji između vrsta nego sukcesivni ontogenetski stupnjevi u okviru jedne iste vrste, sa najvećim nivoom integracije u juvenilnom stupnju. Razlike u obrascima integracije između više akvatičnih i više terestričnih vrsta mrmoljaka su predstavljene nižim stepenom korelacija između homologih elemenata

ekstremiteta, i povećanjem korelacija između elemenata unutar ekstremiteta kod terestričnih vrsta velikih mrmoljaka (kao *T. karelinii*), dok više akvatične vrste (kao *T. dobrogicus*) imaju suprotan obrazac variranja sa većim korelacijama između homologih elemenata ekstremiteta nego između elemenata unutar ekstremiteta.

5. Visoki nivo integracije prisutan u juvenilnom stupnju predstavlja funkciju brzog, koordinisanog rasta skeleta ekstremiteta tokom perioda u okviru koga sistemski hormoni imaju odlučujuću ulogu, dok je niska ukupna integracija na adultnom stupnju je najverovatnije rezultat mnogih lokalnih i globalnih-sistemskih faktora koji menjaju jedan drugome efekat u vremenu i prostoru, pri čemu bifazični životni ciklus sa larvenim, juvenilnim i adultnim stupnjem koji imaju različite morfologije, ekološke sredine i preference, načine ishrane i lokomocije, imaju odlučujuću ulogu u ontogenetskim promenama morfološke integracije i modularnosti.
6. Analiza kod tri vrste mrmoljaka je ukazala na važan uticaj heterohronije u ranom periodu pre metamorfoze. Uporedna analiza osifikacionih sekvenci ekstremiteta utvrdila je postojanje nekoliko sinapomorfnih heterohroničnih promena kod velikih krestastih mrmoljaka, koje uključuju kašnjenje u sekvenci drugog prsta i ubrzanje metakarpalnog elementa III i metatarzalnog elementa V. Ove heterohronične promene su važne za razmatranje morfološke evolucije ekstremiteta kod velikih krestastih mrmoljaka jer uključuju promenu preaksijalne ka postaksijalnoj dominaciji u razvojnoj sekvenci, koja nije poznata kod repatih vodozemaca. Kašnjenje u osifikaciji drugog prsta i postaksijalna dominacija kod velikih mrmoljaka, se ne može objasniti kao adaptivna promena, bilo da se razmatra larvena ili adultna faza životnog ciklusa velikih mrmoljaka.

7. Veliki krestasti mrmoljci se odlikuju nižim variranjem pojedinačnih elemenata u sekvenci nego kada se analizira variranje elemenata kod svih vrsta mrmoljaka zajedno. Specifične promene u osifikacionoj sekvenci praćene niskim nivoom variranja položaja pojedinačnih elemenata u sekvenci, ukazuju na složene promene u obrascima razvića ekstremiteta kod velikih krestastih mrmoljaka, posmatranih u odnosu na sestrinsku vrstu *T. marmoratus*. Analiza osifikacionih sekvenci kod velikih mrmoljaka je utvrdila česte promene u redosledu razvojnih događaja koje su povezane sa promenama u autopodijumu, i to posebno falangealnim elementima, bez značajne veze sa tipom kretanja ili tipom staništa (akvatična/terestrična).

8. Analiza alometrijskih obrazaca variranja ekstremiteta velikih mrmoljaka je pokazala postojanje promena zajedničkih za sve vrste mrmoljaka, kao i promena koje su specifične samo za pojedine vrste. Dva važna rezultata su uočena: osobenosti obrazaca rasta kod vrste *T. dobrogicus*, kao i zajednički obrazac rasta nakon završene metamorfoze kod svih vrsta velikih mrmoljaka. Razlike u dužini ekstremiteta su prisutne tokom metamorfoze posle koje sledi ujednačen i paralelan rast svih elemenata ekstremiteta relativan u odnosu na dužinu tela kod različitih vrsta. Specifični morfotip kod vrste *T. dobrogicus* se odlikuje različitom stopom rasta u odnosu na druge vrste mrmoljaka, dok je variranje kod adultnih jedinki vrsta *T. cristatus* i *T. macedonicus* nastalo tokom ranijih faza u razviću ekstremiteta. Ovi rezultati ukazuju na verovatni uticaj i ulogu kako prirodne selekcije, tako i unutrašnjih-razvojnih mehanizama koji regulišu variranje dužine ekstremiteta tokom diverzifikacije velikih mrmoljaka.

9. Rezultati ove studije su pokazali značajan uticaj morfološke integracije, modularnosti i razvojnih ograničenja u kreiranju fenotipske varijabilnosti u ekstremitetima velikih krestastih mrmoljaka.

7. LITERATURA

Ackermann, R.R. (2005). Ontogenetic integration of the hominoid face. *J. Hum. Evol.* 48: 175-197.

Alberch, P. (1980). Ontogenesis and morphological diversification. *American Zoologist*, 20: 653-667.

Alberch, P. (1982). Developmental Constraints in Evolutionary Processes. in J. T. Bonner, (ed.), *Evolution and Development*. New York: Springer-Verlag, pp. 313-332.

Alberch, P. (1983). Morphological variation in the neotropical salamander genus *Bolitoglossa*. *Evolution* 37: 906-919.

Alberch, P. (1989). The logic of monsters: Evidence for internal constraint in development and evolution. *Geobios* 12: 21-57.

Alberch, P., Gale, E.A. (1983). Size dependence during the development of the amphibian foot. Colchicine-induced digital loss and reduction. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 76: 177-197.

Alberch, P., Alberch, J. (1981). Heterochronic mechanisms of morphological diversification and evolutionary change in the neotropical salamander *Bolitoglossa occidentalis*. *J. Morphol.* 167: 249-264.

Alberch, P., Gould, S.J., Oster, G.F., Wake, D.B. (1979). Size and shape in ontogeny and phylogeny. *Paleobiology* 5: 296-317.

Anderson, S.J., Reisz, R.R., Scott, D., Frobisch, N.B., Sumida, S.S. (2008). A stem batrachian from the Early Permian of Texas and the origin of frogs and salamanders. *Nature*, 453: 515-518.

Andreone, F., Giacoma, C. (1989). Breeding dynamics of *Triturus carnifex* at a pond in northwestern Italy (Amphibia, Urodela, Salamandridae). *Holarct. Ecol.* 12: 219-223.

Arntzen, J.W., Themudo, G.E., Wielstra, B. (2007). The phylogeny of crested newts (*Triturus cristatus superspecies*): nuclear and mitochondrial genetic characters suggest a hard polytomy, in line with the paeogeography of the centre of origin. *Contributions to Zoology*, 76: 261-278.

Arntzen, J.W., Sparreboom, M. (1989). A phylogeny for the Old World newts, genus *Triturus*: Biochemical and behavioural data. *J. Zool. Lond.* 219: 645-664.

Arntzen, J.W., Wallis, G.P. (1999). Geographic variation and taxonomy of crested newts (*Triturus cristatus superspecies*): morphological and mitochondrial DNA data. *Contrib. Zool.* 68: 181-203.

Arntzen, J.W. (2003). *Triturus cristatus Superspezies* - Kammolch Artenkreis (*Triturus cristatus* (Laurenti, 1768) - Nördlicher Kammolch, *Triturus carnifex* (Laurenti, 1768) - Italienischer Kammolch, *Triturus dobrogicus* (Kiritzescu, 1903) - Donau- Kammolch, *Triturus karelinii* (Strauch, 1870) - Südlicher Kammolch). In: Grossenbacher K, Thiesmeier B, editors. *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas – Band 4/IIA: Schwanzlurche (Urodela) IIA*, AULA-Verlag, Wiebelsheim. p 421-514.

Atchley, W.R., B. K. Hall. (1991). A model for development and evolution of complex morphological structures. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 66: 101-157.

Azizi, E., Horton, J.M. (2004). Patterns of axial and appendicular movements during aquatic walking in the salamander *Siren lacertina*. *Zoology* 107: 111-120.

Badyaev, A.V., Foresman, K.R. (2000). Extreme environmental change and evolution: stressinduced morphological variation is strongly concordant with patterns of evolutionary divergence in shrew mandibles. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 267: 371–377.

Badyaev, A.V., Foresman, K.R., Young, R.L. (2005). Evolution of morphological integration. II. Developmental accommodation of stress-induced variation in shrew mandibles. *Am. Nat.* 166: 382–395.

Bickelmann, C., Mitgutsch, C., Richardson, M.K, Jiménez, R., de Bakker, M.A.G., Sánchez-Villagra, M.R. (2012). Transcriptional heterochrony in talpid mole autopods. *EvoDevo* 3, 16.

Bininda-Emonds, O. R. P., J. E. Jeffery, M. R. Sánchez-Villagra, J. Hanken, M. Colbert, C. Pieau, L. Selwood, C. Ten Cate, A. Raynaud, C. Osabutey, and M. K. Richardson. (2007). Forelimb-hind limb developmental timing across tetrapods. *BMC Evol. Biol.* 7:182-189.

Blanco, M.J., Alberch, P. (1992). Caenogenesis, Developmental Variability and Evolution in the carpus and tarsus of the Marbled newt *Triturus marmoratus*. *Evolution* 46: 677-687.

Bolker, J.A. (2000). Modularity in development and why it matters to Evo-Devo. *American Zoologist.* 40: 770-776.

Bruce, R.C. (2003). Life histories. in *Reproductive Biology and Phylogeny*. Vol. 1, *Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela*: 477–526. D. M. Sever (Ed.). Enfield. Science Publisher Inc.

Bryant, S.V., Muneoka, K. (1986). Views of limb development and regeneration. *Trends. Genet.* 2: 153–159.

Buckley, D., Alcobendas, M., Garcia-Paris, M., Wake, M.H. (2007). Heterochrony, cannibalism, and the evolution of viviparity in *Salamandra salamandra*. *Evol. Dev.* 9: 105–115.

Cane, W.P. (1993). The ontogeny of postcranial integration in the common tern, *Sterna hirundo*. *Evolution* 47: 1138–1151.

Carroll, S.B. (2001). Chance and necessity: the evolution of morphological complexity and diversity. *Nature*: 409: 1102–1109.

Carroll, S.B. (2008). Evo-Devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution. *Cell*: 134: 25–36.

Cheverud, J. M. (1982). Phenotypic, genetic, and environmental integration in the cranium. *Evolution* 36: 499–516.

Cheverud, J. M. (1984). Quantitative genetic and developmental constraints on evolution by selection. *Journal of Theoretical Biology*, 110, 155–171.

Cheverud, J. M. (1988). A comparison of genetic and phenotypic correlations. *Evolution*, 42(5), 958–968.

Cheverud, J.M. (1989). A comparative analysis of morphological variation patterns in the papionins. *Evolution* 43: 1737–1747.

Cheverud, J.M. (1996). Developmental integration and the evolution of pleiotropy. *American Zoologist* 36: 44–50.

Chipman, A.D., A. Haas, E. Tchernov, O. Khaner. (2000). Variation in anuran embryogenesis: differences in sequence and timing of early developmental events. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)*, 288: 352–365.

Cooper, D. M., Thomas, C. D., Clement, J. G., Turinsky, A. L., Sensen, C. W., and Hallgrímsson, B. (2007). Age-dependent change in the 3D structure of cortical porosity at the human femoral midshaft. *Bone* 40 (4): 957–965.

- Crnobrnja-Isailović, J., Džukić, G., Krstić, N., Kalezić, M.L. (1997). Evolutionary and paleogeographical effects on the distribution of the *Triturus cristatus superspecies* in the central Balkans. *Amphibia-Reptilia*, 18: 321-332.
- Cvijanović, M., Ivanović, A., Tomašević Kolarov, N., Džukić, G., Kalezić, M.L. (2009). Early ontogeny shows the same interspecific variation as natural history parameters in the crested newt (*Triturus cristatus superspecies*) (Caudata, Salamandridae). *Contribution to Zoology*, 78: 43-50.
- Davis, A. P., D. P. Witte, H. M. Hsieh-Li, S. S. Potter, and M. R. Capecchi. (1995). Absence of radius and ulna in mice lacking Hoxa-J1 and Hoxd-J1. *Nature* 375: 791-795.
- De Beer, G.R. (1958). *Embryos and Ancestors*. Oxford University Press, Oxford.
- Denoël, M., Joly, P., Whiteman, H.H. (2005). Evolutionary ecology of facultative paedomorphosis in newts and salamanders. *Biol. Rev.* 80: 663-671.
- Denoël, M. (2002). Paedomorphosis in the Alpine newt (*Triturus alpestris*): decoupling behavioural and morphological change. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 52: 394-399.
- Dingerkus, G., Uhler, L.D. (1977). Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain. Tech.* 52: 229-232.
- Dolle, P., Dierich, A., LeMeur, M., Schimmang, T., Schuhbaur, B., Chambon, P., and Duboule, D. (1993). Disruption of the Hoxd 13 gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. *Cell* 75: 431-441.
- Dudley, A. T., M. A. Ros, and C. J. Tabin. (2002). A reexamination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature* 418: 539-544.
- Dudley, A. T., and C. J. Tabin. (2000). Constructive antagonism in limb development. *Curr. Op. Genet. Dev.* 10: 387-392.
- Duellman, W.E., Trueb, L. (1994). *Biology of Amphibians*. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Džukić, G. (1993). *Fauna, zoogeografija i zaštita repatih vodozemaca (Caudata) Srbije*. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Eble, G.J. (2005). Morphological modularity and macroevolution: conceptual and empirical aspects. In: *Modularity: Understanding the Development and Evolution of Complex Natural Systems*. E. Callebaut & D. Rasskin-Gutman (eds.), pp. 221-238. MIT Press, Cambridge.

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: Standardized Major Axis Tests and Routines, version 2.0: (<http://www.bio.mq.edu.au/ecology/SMATR/>)

Fischer-Rousseau, L., Cloutier, R., Zelditch, M.L. (2009). Morphological integration and developmental progress during fish ontogeny in two contrasting habitats. *Evol. Dev.* 11: 740-753.

Franssen, R.A., Marks, S., Wake, D., Shubin, N. (2005). Limb chondrogenesis of the seepage salamander, *Desmognathus aeneus* (Amphibia: Plethodontidae). *J Morphol* 265: 87-101.

Fröbisch, N.B., Shubin, N.H. (2011). Salamander limb development: Integrating genes, morphology and fossils. *Dev. Dynam.* 240: 1087-1099.

Fröbisch, N.B. (2008). Ossification patterns in the tetrapod limb-conservation and divergence from morphogenetic events. *Biol. Rev.* 83: 571-600.

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

Galis, F., Metz, J.A.J. (2001) Testing the vulnerability of the phylotypic stage: on modularity and evolutionary conservation. *J. Exp. Zool.*, 291: 195-204.

Galis, F. (1999) Why do almost all mammals have seven cervical vertebrae? Developmental constraints, Hox genes, and cancer. *J. Exp. Zool.*, 285: 19-26.

Gallien, L., Durocher, M. (1957). Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltlii* Michah Bull. Biol. Fr. Belg., 91: 97-114.

Gardiner, D.M., Blumberg, B., Komine, Y., Bryant, S.V. (1995). Regulation of HoxA expression in developing and regenerating axolotl limbs. *Development* 121: 1731-1741.

Glücksohn, S. (1932). Äussere Entwicklung der Extremitäten und Studieneinteilung der Larvenperiode von *Triton taeniatus* Leyd. und *Triton cristatus* Laur. *Archiv Entwicklungsmechanik Organismen* 125: 341-405.

Goswami, A., Polly, P.D. (2010). The influence of modularity on cranial morphological disparity in Carnivora and Primates (Mammalia). *PloSOne*, 5(3):e9517

Gould, S.J. (1977). *Ontogeny and Phylogeny*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA.

Griffiths 1996 Griffiths RA. 1996. *Newts and Salamanders of Europe*. San Diego, CA: Academic Press Inc.

Grünbaum, T., Cloutier, R., Dumont, P. (2003). Congruence between chondrification and ossification sequences during caudal skeleton development: a *Moxostomatini* case study. In *The Big Fish Bang. Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference*. Browman, H.I. & Skiftesvik, A.B. (Ed.). Institute of Marine Research, Postboks 1870 Nordnes, Bergen.

Gvoždik, L., Van Damme, R. (2006). *Triturus* newts defy the running-swimming dilemma. *Evolution* 60: 2110-2121.

Hall, B.K. (2000). Evo-devo or devo-evo – does it matter? *Evol Dev.* 2: 177-88.

Hall, B. K. (1996). Bauplane, phylotypic stages, and constraint: why there are so few types of animals. In M. Hecht, B. Wallace, and M. Clegg (eds.). *Evolutionary Biology*. Plenum, New York, pp. 215-261.

Hall, B.K. (2012). *Evolutionary Developmental Biology (Evo-Devo): Past, Present, and Future*. *Evolution: Education and Outreach*, 2012 *Evo Edu Outreach* 5:184-193.

Hallgrímsson, B., Lieberman, D. E., Young, N. E., Parsons, T. E., Wat, S. (2007). Evolution of covariance in the mammalian skull. *Novartis Found Symp. (Tinkering – The Microevolution of Development)* 284: 164-190.

Hallgrímsson, B., Jamniczky, H., Young, N.M., Rolian, C., Parsons, T.E., Boughner, J.C., Marcucio, R.S. (2009). Deciphering the palimpsest: studying the relationship between morphological integration and phenotypic covariation. *Evol Biol* 36: 355-376.

Hallgrímsson, B., Wilmore, K., Hall, B.K. (2002). Canalization, developmental stability, and morphological intergration in primate limbs. *Yearbook of Physical Anthropology*, 45: 131-158.

Hanken, J., Dinsmore, C. E. (1986). Geographic variation in the limb skeleton of the red-backed salamander, *Plethodon cinereus*. *Journal of Herpetology* 20: 97-101.

Hanken, J., D.H. Jennings, L. Olsson. (1997). Mechanistic basis of life-history evolution in anuran amphibians: direct development *Amer. Zool.*, 37: 160-171.

Hanken, J. (1983). High incidence of limb skeletal variation in a peripheral population of the red-backed salamander, *Plethodon cinereus* (Amphibia, Plethodontidae) from Nova Scotia. *Canadian Journal of Zoology* 61: 1925-1931.

Hanken, J. (1989). Development and evolution in amphibians. *Am. Sci.* 77, 336-343.

Hanken, J. (1992). Life history and morphological evolution. *J. Evol. Biol.* 5, 549-557.

Harrison, L.B., Larsson, H.C.E. (2008). Estimating evolution of temporal sequence changes: a practical approach to inferring ancestral developmental sequences and sequence heterochrony. *Syst. Biol.* 57: 378-387.

Hinchliffe, J.R., Vorobyeva, E.I. (1999). Developmental Basis of Limb Homology in Urodeles: Heterochronic Evidence from the Primitive Hynobiid Family. In *Homology*: 95-109. Bock, W. (Ed.). Chichester: Wiley.

Hendrikse, J.L., Parsons, T.E., Hallgrímsson, B. (2007). Evolvability as the proper focus of evolutionary developmental biology. *Evolution and Development* 9: 393-401.

Holmgren, N. (1933). On the origin of the tetrapod limb. *Acta Zool* 14: 185-295.

Holmgren, N. (1939). Contribution to the question of the origin of the tetrapod limb. *Acta Zool* 20: 89-124.

Hood, G. (2004). Poptools, ver. 2.62. CSIRO, Canberra. See <http://www.cse.csiro.au/poptools>

Hugi, J., Hutchinson, M.N., Koyabu, D., Sánchez-Villagra, M.R. (2012). Heterochronic shifts in the ossification sequences of surface- and subsurface-

dwelling skinks are correlated with the degree of limb reduction. *Zoology* 115: 188-198.

Ivanović, A., Kalezić, M.L., Aleksić, I. (2005). Morphological integration of cranium and postcranial skeleton during ontogeny of facultative paedomorphic European newts (*Triturus vulgaris* and *T. alpestris*). *Amphibia-Reptilia* 26: 485-495.

Ivanović, A., Vukov, T., Tomašević, N., Džukić, G., 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.M., 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.

Ivanović, A., Sotiropoulos, K., Furtula, M., Džukić, G., Kalezić, M.L. (2008c). Sexual size and shape evolution in European newts (Amphibia: Caudata, Salamandridae) in the Balkans. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 95: 348-239.

Ivanović, A., Cvijanović, M., Kalezić, M.L. (2011). Ontogeny of body size and shape and metamorphosis: insights from the crested newts. *Journal of Zoology*, 283: 153-161.

Ivanović, A., Džukić, G., Kalezić, M.L. (2012). A phenotypic point of view of the adaptive radiation of crested newts (*Triturus cristatus superspecies*, Caudata, Amphibia). *Int. J Evol. Biol.* 2012.

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

Jablonski, D. (2005). Evolutionary innovations in the fossil record: the intersection of ecology, development, and macroevolution. *J Exp Zool B (Mol Dev Evol)* 304B: 504-519.

- Kalezić, M.L., Djorović, A. (1998). Life history dependent sexual size dimorphism in the crested newt (*Triturus carnifex*, Caudata). *Folia-Zoologica*, 317-319.
- Kalezić, M.L., Džukić, G., Mesaroš, G., Crnobrnja-Isailović, J. (1997). The crested newt (*Triturus cristatus Superspecies*) in ex-Yugoslavia: morphological structuring and distribution patterns. *University Thoughts, Priština*, 4: 39-46.
- Kemp, T.S. (2007). The origin of higher taxa: macroevolutionary processes, and the case of the mammals. *Acta Zoologica*, 88: 3-22.
- Klingenberg, C.P. (1998). Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biological Reviews*, 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. Oxford University Press, New York.
- Klingenberg, C.P. (2005). Developmental constraints, modules and evolvability. In: *Variation*. B. Hallgrímsson & B. K. Hall (eds.), pp. 219-247. San Diego, Academic Press.
- Klingenberg, C.P. (2008). Morphological integration and developmental modularity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 39: 115-132.
- Klingenberg, C.P. (2010a). Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nature Reviews/Genetics*, 11:623-635.
- Klingenberg, C.P. (2010b). There's something afoot in the evolution of ontogenies. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 221.
- Koyabu, D., Endo, H., Mitgutsch, C., Suwa, G., Catania, K.C., Zollikofer, C.P.E., Oda, S.O., Koyasu, K., Ando, M., Sánchez-Villagra, M.R. (2011). Heterochrony and developmental modularity of cranial osteogenesis in lipotyphlan mammals. *EvoDevo* 2, 21.
- Lande, R., Arnold, S. J. (1983). The measurement of selection on correlated characters. *Evolution* 37, 1210-1226.
- Lanza, B., Arntzen, J.W., Gentile, E. (2010). Vertebral numbers in the Caudata of the western Palaearctic (Amphibia). *Atti Museum Civ Stor Nat Trieste* 54:3-114.

Lawler, R.R. (2008). Morphological integration and natural selection in the postcranium of wild verreaux's sifaka (*Propithecus verreauxi verreauxi*). *American Journal of Physical Anthropology* 136: 204-213.

Lü, J., Unwin, D.M., Jin, X., Liu, Y., Ji, Q. (2010). Evidence for modular evolution in a long-tailed pterosaur with a pterodactyloid skull. *Proceedings of the Royal Society of London B* 277B: 383-389.

Magwene, P. M. (2001). New tools for studying integration and modularity. *Evolution* 55: 1734- 1745.

Magwene, P.M. (2001). New tools for studying integration and modularity. *Evolution* 55: 1734-1745.

Manly, B. (1991). *Randomization and Monte Carlo Methods in Biology*. London: Chapman and Hall.

Mantel, N.A. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer. Res.* 27: 209-220.

Marcus, L. (1990). Traditional morphometrics. Pp. 77-122 in F. J. Rohlf and F. L. Bookstein, eds. *Proceedings of the Michigan morphometrics workshop*. Univ. of Michigan Museum of Zoology, Ann Arbor.

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.

Maxwell, E.E., Harrison, L.B., Larsson, H.C.E. (2010). Assessing the phylogenetic utility of sequence heterochrony: evolution of avian ossification sequences as a case study. *Zoology* 113: 57-66.

Maynard Smith, J., Burian, R., Kauffman, S., Alberch, P., Campbell, J., Goodwin, B., Lande, R., Raup, D., Wolpert, L. (1985). Developmental constraints and evolution: a perspective from the Mountain Lake Conference on Development and Evolution. *Q. Rev. Biol.* 60:265-287.

McKinney, M.L. (1988). *Heterochrony in Evolution*. Plenum, New York.

Miaud, C., Joly, P., Castanet, J. (1993). Variation in age structure in a subdivided population of *Triturus cristatus*. *Canadian Journal of Zoology*, 71: 1874-1879.

- Monteiro, L.R., Nogueira, M.R. (2010). Adaptive radiations, ecological specialization, and the evolutionary integration of complex morphological structures. *Evolution*, 64:724-744.
- Müller, G.B., Wagner, G.P. (1991). Novelty in evolution: restructuring the concept. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22: 229- 256.
- Müller, G.B. (2007). Evo-devo: extending the evolutionary synthesis. *Nature /Reviews/Genetics*, 8:943-949.
- Müller, G.B., Newman, S.A. (2005). The innovation triad: an EvoDevo agenda. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 304: 487-503.
- Olgun, K., Uzum, N., Avci, A., Miaud, C. (2005). Age, size and growth of the souther newt *Triturus karelinii* (Strauch 1870) in a population from Bozdag (Western Turkey). *Amphibia-Reptilia*, 26:223-230.
- Olson, E.C., Miller, R.C. (1958). *Morphological Integration*. University of Chicago Press, Chicago.
- Orr, M.R., Smith, T.B. (1998). Ecology and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 13, 502-506.
- Pavlicev, M., Cheverud, J.M., Wagner, G.P. (2009). Measuring morphological integration using eigenvalue variance. *Evol. Biol.* 36:157-170.
- Pigliucci, M. (2003). Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes. *Ecological Letters*, 6: 265-272.
- Piras, P., Salvi, D., Ferrara, F., Maiorino, L., Delfino, M., Pedde, L., Kotsakis, T. (2011). The role of post-natal ontogeny in the evolution of phenotypic diversity in *Podarcis* lizards. *Journal of Evolutionary Biology*, 24: 2705-2720.
- Porto, A., De Oliveira, F.B., Shirai, L.T., De Conto, V., Marroig, G. (2009). The evolution of modularity in the mammalian skull I: Morphological intergration patterns and magnitudes. *Evolutionary Biology*, 36: 118-135.
- Prum, R.O. (1999). Development and evolutionary origin of feathers. *J. Exp. Zool. B (Mol. Dev. Evol.)*. 285: 291-306.
- Rabl, C. (1910). Gedanken und studien uber den ursprung der extremitaten. *Zeifschrift fuer Wiss Zoologie* 70: 474-558.
- Raff, R.A. (2007). Written in stone: fossils, genes and evo-devo. *Nature/Reviews/Genetics*, 8: 911-920.

Raff, R.A. (1992). Direct-developing sea urchins and the evolutionary reorganization of early development *Bioessays*, 14: 211-218.

Raff, R.A. (1996). *The Shape of Life: Genes, Development, and the Evolution of Animal Form*. University of Chicago Press, Chicago

Reilly, S.M., Wiley, E.O., Meinhardt, D.J. (1997). An integrative approach to heterochrony: the distinction between interspecific and intraspecific phenomena. *Biological Journal of the Linnean Society*, 60: 119-143.

Richardson, M.K. (1995). Heterochrony and the phylotypic period. *Dev. Bio.* 172: 412-421.

Richardson, M.K., Chipman, A.D. (2003). Developmental constraints in a comparative framework: a test case using variations in phalanx number during amniote evolution *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 296B: 8-22.

Richardson, M.K., Oelschlaeger, H.A. (2002). Time, pattern and heterochrony: a study of hyperphalangy in the dolphin embryo flipper. *Evol. Dev.* 4: 435-444.

Richardson, M.K., Gobes, S.M.H., Van Leeuwen, A.C., Polman, J.A.E., Pieau, C., Sánchez- Villagra, M.R. (2009). Heterochrony in limb evolution: developmental mechanisms and natural selection. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 312: 639-664.

Rienesl, J., Wagner G. P. (1992). Constancy and change of basipodial variation patterns: a comparative study of crested and marbled newts - *Triturus cristatus*, *Triturus marmoratus* - and their natural hybrids. *Journal of Evolutionary Biology* 5: 307-324.

Rieppel, O. (2005). Modules, kinds, and homology. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 304B: 18-27.

Roff, D.A. (1997). *Evolutionary Quantitative Genetics*. Chapman and Hall, New York.

Rohlf, F.J. (2005). TpsDig program, version 2.04, Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook. See <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>

Russell, E.S. (1916). *Form and Function*. John Murry Ltd., London.

Ryan, T.J., Semlitsch, R.D. (2000). Growth and the expression of alternative life cycles in the salamander *Ambystoma talpoideum* (Caudata: Ambystomatidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 80: 639-646.

Sanger, T.J. (2008). The Evolution and Development of the Tetrapod Limb. PhD thesis, Washington University.

Schmalhausen (1910 Schmalhausen, J.J. (1910). Die Entwicklung des Extremitätenskelettes von *Salamandrella kayserlingii*. *Anat. Anz.* 37, 431-446.

Schwenk, K. (1995). A utilitarian approach to evolutionary constraint. *Zoology*, 98: 251-262.

Sears, K. (2004). Constraints on the morphological evolution of marsupial shoulder girdles. *Evolution* 58: 2353-2370.

Sears, K.E. (2009). Differences in the timing of prechondrogenic limb development in mammals: the marsupial-placental dichotomy resolved. *Evolution* 63: 2193-2200.

Shapiro, M.D., Hanken, J., Rosenthal, N. (2003). Developmental basis of evolutionary digit loss in the Australian lizard *Hemiergis*. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 297: 48-56.

Sheets, H.D. (2000). Integrated Morphometrics Package (IMP). See <http://www2.canasius.edu/~sheets/>

Shubin, N. (1995). The evolution of paired fins and the origin of tetrapod limbs: phylogenetic and transformational approaches. *Evol Biol* 28: 39-86.

Shubin, N.H. (2002). Origin of evolutionary novelty: Examples from limbs. *J. Morphol.* 252: 15-28.

Shubin, N. H., Alberch, P. (1986). A morphogenetic approach to the origin and basic organisation of tetrapod limb. *Evolutionary Biology* 5: 319-381.

Shubin, N., Wake, D.B. (1996). Phylogeny, variation and morphological integration. *American Zoologist*, 36: 51-60.

Shubin, N. H., Wake, D. B. (2003). Morphological Variation, development, and evolution of the limb skeleton in salamanders. In: Heatwole H. (ed.) *Amphibian Biology*, 5. Osteology. Surrey and Betty, Sydney.

Shubin, N., Wake, D. B., Crawford, A. J. (1995). Morphological variation in the limbs of *Taricha granulosa* (Caudata: Salamandridae): Evolutionary and phylogenetic implications. *Evolution* 49: 874-884.

Smith, K.K. (2001b). Heterochrony revisited: The evolution of developmental sequences. *Bio. J. Linn. Soc.* 73: 169-186.

Smith, K.K. (2002). Sequence heterochrony and the evolution of development. *J. Morph.* 252: 82-97.

Sokal, R. R., Rohlf F. J. (1981). *Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research.* 2nd edition. W. H. Freeman and Company, New York.

Stopper, G.F., G.P. Wagner. (2007). Inhibition of Sonic hedgehog signaling leads to posterior digit loss in *Ambystoma mexicanum*: parallels to natural digit reduction in urodeles *Dev. Dyn.* 236: 321-331.

Tank, P.W., Carlson, B.M., Connelly, T.G. (1977). A scanning electron microscopic comparison of the development of embryonic and regenerating limbs in the axolotl. *J. Exp. Zool.* 201: 417-429.

Tomašević Kolarov, N., Ivanović, A., Kalezić, ML. (2011). Morphological integration and ontogenetic niche shift: a study of crested newt limbs. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 316: 296-305.

Tomašević Kolarov, N. (2013). Heterochrony and limb form variation in crested newts. *Journal of Zoology* 290: 68-79.

Torok, M.A., Gardiner, D.M., Izpisua-Belmonte, J.C., Bryant, S.V. (1999). Sonic Hedgehog (shh) expression in developing and regenerating axolotl limbs. *J. Exp. Zool.* 284: 197-206.

Van Valen, L. (1965a). Morphological variation and width of ecological niche. *American Naturalist*, 99: 377-390.

Van Valen, L. (1965b). The study of morphological integration. *Evolution* 19: 347-349.

Van Valen, L. (2005). The statistics of variation. In: Hallgrímsson B, Hall BK, editors. *Variation: A Central Concept in Biology.* London: Elsevier Academic Press. pp. 29-46.

Vogl, C., Rienesl, J. (1991). Testing for developmental constraints: carpal fusions in urodeles. *Evolution* 45: 1516-1519.

Vorobyeva, E.I. (2009). Morphogenetic approach to the formation of paired limbs in the course of tetrapodization. *Biol. Bull.* 36: 139-147.

Vorobyeva, E.I., Hinchliffe, J.R. (1996). From fins to limbs. *Evolutionary Biology* 29: 263-311.

Vorobyeva, E.I., Mednikov, D.N. (2004). Ossification of the Limb Skeleton in *Triturus vittatus* and *Salamandrella keyserlingii*. *Doklady Biological Sciences* 394, 840-844.

Vorobyeva, E.I., Mednikov, D.N. (2007). The order of ossification of skeletal elements in the legs of *Ranodon sibiricus kessler* (Hynobiidae, Caudata). *Doklady Biological Sciences* 417, 449-452.

Vukov T. 2009. Filogenetski odnosi velikih mrmoljaka, *Triturus cristatus superspecies* (Salamandridae, Caudata) na Balkanskom poluostrvu. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Vukov, T.D., Sotiropoulos, K., Wielstra, B., Džukić, G., Kalezić, M.L. (2011). The evolution of the adult body form of the crested newt (*Triturus cristatus superspecies*, Caudata, Salamandridae). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 49: 324-334.

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.

Wagner, G.P. (1984). On the eigenvalue distribution of genetic and phenotypic dispersion matrices – evidence for a nonrandom organization of quantitative character variation. *J Math Biol* 21: 77-95.

Wagner, G. P. (1995). Adaptation and the modular design of organisms. In F. Mora'n, A. Moreno, J. J. Merelo, and P. Chaco'n (eds.). *Advances in Artificial Life*. Springer Verlag, Berlin, pp. 317-328.

Wagner, G. P. (1996). Homologues, natural kinds and the evolution of modularity. *Am. Zool.* 36: 36-43.

Wagner, G.P., Altenberg, L. (1996). Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution*, 50: 967-976.

Wagner, G. P., Mezey, J. G. (2003). The role of genetic architecture constraints in the origin of variational modularity. In G. Schlosser and G. P.

Wanger (eds.). Modularity in Development and Evolution. The University of Chicago Press, Chicago, pp. 338–358.

Wagner, G.P., Müller, G.B. (2002). Evolutionary innovations overcome ancestral constraints: a re-examination of character evolution in male sepsid flies (Diptera: Sepsidae). *Evolution and Development*, 4: 1-6.

Wake, D.B., Shubin, N. (1998). Limb development in the Pacific giant salamanders, *Dicamptodon* (Amphibia, Caudata, Dicamptodontidae). *Can J Zool* 76:2058 –2066.

Wake, T.A., Wake, D.B., Wake, M.H. (1983). The ossification sequence of *Aneides lugubris*, with comments on heterochrony. *J. Herpetol.* 17, 10-22.

Wake, M.H. (1986). The morphology of *Idiocranium russeli* (Amphibia: Gymnophiona), with comments on miniaturization through heterochrony. *J. Morph.* 189: 1-16.

Wallace, H. (1994). The balanced lethal system of crested newts. *Heredity*, 73: 41-46.

Wallis, G.P., Arntzen, J.W. (1989). Mitochondrial-DNA variation in the crested newt superspecies: limited cytoplasmic gene flow among species. *Evolution*, 43: 88- 104.

Warton, D. I., Wright, I. J., Falster, D. S., Westoby, M. (2006). Bivariate line-fitting methods for allometry. *Biological Review* 81: 259-291.

Webster, M., Zelditch, M.L. (2005). Evolutionary modifications of ontogeny: heterochrony and beyond. *Paleobiology*, 31: 354-372.

Weisbecker, V., Goswami, A., Wroe, S., Sánchez -Villagra, M.R. (2008). Ossification heterochrony in the therian postcranial skeleton and the marsupial-placental dichotomy. *Evolution* 62: 2027-2041.

Wielstra, B., Arntzen, J.W. (2011). Unraveling the rapid radiation of crested newts (*Triturus cristatus superspecies*) using complete mitogenomic sequence. *BMC Evol. Biol.* 11, 162.

Wielstra, B., Espregueira Themudo, G., Güclü, Ö., Olgun, K., Poyarkov, N.A., Arntzen, J.W. (2010). Cryptic crested newt diversity at the Eurasian transition: the mitochondrial DNA phylogeography of Near Eastern *Triturus* newts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56: 888-896.

Wiens, J.J., Slingluff, J.L. (2001). How lizards turn into snakes: a phylogenetic analysis of body-form evolution in anguid lizards. *Evolution* 55: 2303-2318.

Willmore, K.E., Young, N.M., Richtsmeier, J.T. (2007). Phenotypic variability: its components, measurement and underlying developmental processes. *Evol Biol* 34: 99-120.

Willmore, K.E., Leamy, L., Hallgrímsson, B. (2006). Effects of developmental and functional interactions on mouse cranial variability through late ontogeny. *Evol Dev* 8: 550-567.

Willmore, K.E. (2012). An Introduction to Evolutionary Developmental Biology *Evo. Edu. Outreach* 5:181-183

Wilson, L.A.B., Sánchez-Villagra, M.R. (2009). Diversity trends and their ontogenetic basis: an exploration of allometric disparity in rodents. *Proc R. Soc. B.* 277, 1227-1234.

Winther, R.G. (2001). Varieties of modules: kinds, levels, origins, and behaviors. *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)*, 291: 116- 129.

Wolpert, L. (2002). The progress zone model for specifying positional information. *Int. J. Dev. Biol.* 46:869-870.

Wright, S. (1968). *Evolution and the genetics of populations*. Univ. of Chicago Press, Chicago.

Young, N.M., Hallgrímsson, B. (2005). Serial homology and the evolution of mammalian limb covariation structure. *Evolution*, 59:2691-2704.

Young, N.M., Wagner, G.P., Hallgrímsson, B. (2010). Development and the evolvability of human limbs. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 3401-3405.

Young, N.M., Hallgrímsson, B., Garland, T.Jr. (2009). Epigenetic effects on integration of limb lengths in a mouse model: selective breeding for high voluntary locomotor activity. *Evol Biol* 36: 88-99.

Young, N.M. (2006). Function, ontogeny and canalization of shape variance in the primate scapula. *J Anat* 209: 623-636.

Zaffaroni, N. P., Arias, E., Zavanella, T. (1992). Natural variation in the limb skeletal pattern of the crested newt, *Triturus cristatus* (Amphibia, Salamandridae). *Journal of Morphology* 213: 265- 273.

Zaffaroni, N. P., Arias, E., Lombardi, S., Zavanella, T. (1999). Natural variation in the appendicular skeleton of *Triturus carnifex* (Amphibia: Salamandridae). *Journal of Morphology* 230: 167-175.

Zelditch, M.L. (1988). Ontogenetic variation in patterns of phenotypic integration in the laboratory rat. *Evolution* 42: 28-41.

BIOGRAFIJA AUTORA

Nataša Tomašević Kolarov je rođena 12. avgusta 1973. godine u Beogradu gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala školske 1992/1993. godine na studijskoj grupi Biologija. Fakultet je završila 2001. godine, a iste godine je upisala Poslediplomske studije na smeru Genetika, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Tokom 2002. godine radila je kao saradnik u nastavi za predmete Teorija evolucije i Evolucija na katedri za Genetiku i evoluciju Biološkog fakulteta u Beogradu. Iste godine boravila je na Université de Savoie (Le Bourget du Lac, France), gde je u laboratoriji C. Miaud-a (Aquatic Ecosystem and Interfaces) provela četiri nedelje radi usavršavanja metoda skeletohronologije. U 2003. godini je volontirala na Katedri za genetiku i evoluciju, a iste godine se zaposlila kao mlađi asistent na Odeljenju za evolucionu biologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković". Od 2003. godine je uključena u projekat br. 1725 "Evolucija u heterogenim sredinama", čiji je rukovodilac dr. Jelka Crnobrnja-Isailović. Odmah po uključanju u projekat započela je izradu magistarskog rada pod nazivom "Variranje uzrasne strukture, veličine tela i fekunditeta kod *Bufo bufo* (Amphibia, Anura)" koji je i odbranila decembra 2005. godine i stekla zvanje magistra bioloških nauka. U projektnom periodu 2006-2010 angažovana je na projektu br. 143052 "Diverzitet vodozemaca i gmizavaca Balkanskog poluostrva" kojim rukovodi dr Miloš Kalezić. Od tog perioda počinje rad na doktorskoj tezi. U maju 2006 godine je stekla istraživačko zvanje Istraživač saradnik. U projektnom periodu 2011-2015 angažovana je na projektu br. 173043 "Diverzitet vodozemaca i gmizavaca Balkanskog poluostrva-evolucioni aspekti i konzervacija" kojim rukovodi dr Miloš Kalezić.

Nataša Tomašević Kolarov je rezultate svojih istraživanja objavila u časopisima međunarodnog značaja (6 radova kategorije M21; 2 rada kategorije M22; 3 rada kategorije M23), časopisima domaćeg značaja (2 rada) i putem saopštenja sa kongresa međunarodnog sadržaja (9 saopštenja).