

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Marija D. Ilić

**MORFOLOŠKA DIFERENCIJACIJA LARVENIH  
STADIJUMA ODABRANIH VRSTA ŽABA RODOVA  
*RANA* I *BUFO* NA PODRUČJU SRBIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Marija D. Ilić

**MORPHOLOGICAL DIFFERENTIATION OF  
LARVAL STAGES OF SELECTED ANURAN *RANA*  
AND *BUFO* SPECIES IN SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

**Mentori:**

---

**Prof. dr Jelka Crnobrnja-Isailović**, redovni profesor i naučni savetnik  
Univerzitet u Nišu - Prirodno-matematički fakultet,  
Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

---

**Prof. dr Predrag Simonović**, redovni profesor i naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet,  
Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

**Članovi komisije:**

---

**dr Vida Jojić**, viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

---

**dr Gorana Stamenković**, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

---

**Prof. dr Ana Ivanović**, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

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

## Zahvalnica

Istraživanja sprovedena tokom izrade ove doktorske disertacije realizovana su u okviru projekata „Merenje i modeliranje fizičkih, hemijskih, bioloških i morfodinamičkih parametara reka i vodnih akumulacija” (TR37009) i „Biosensing tehnologije i globalni sistem za kontinuirana istraživanja i integrisano upravljanje ekosistemima” (III43002) Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Veliku zahvalnost dugujem mentoru *prof. dr Jelki Crnobrnji-Isailović*, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu i redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, na velikom poverenju koje mi je ukazala, idejama prilikom izbora teme, zajedničkim terenima, kao i na nesebičnoj pomoći i podršci prilikom izrade doktorske disertacije.

Veliko hvala mentoru *prof. dr Predragu Simonoviću*, redovnom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu na sugestijama, korisnim predlozima i smernicama koje su znatno pomogle i unapredile izgled ove disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem *dr Vidi Jojić*, višem naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, na prenetom znanju iz oblasti morfometrije, na velikom ličnom i profesionalnom zalaganju, nesebičnoj pomoći i dragocenim savetima koje su doprineli kvalitetu doktorske disertacije. *Vido*, hvala ti zaista na svemu.

Posebno hvala *dr Gorani Stamenković*, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, pre svega na upoznavanju sa radom u laboratoriji, na pomoći oko molekularno genetičkih analiza i tumačenju rezultata, na sugestijama i razgovorima (naučnim i ličnim) i posebno na divnom prijateljstvu koje traje dugi niz godina.

Najlepše hvala *prof. dr Ani Ivanović*, redovnom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na izdvojenom vremenu, konstruktivnim savetima i korekcijama koje su doprinele kvalitetu doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem rukovodiocu Odeljenja za hidroekologiju i zaštitu voda *dr Momiru Paunoviću*, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, na ukazanom poverenju i podršci od samog početka, kao i na konstruktivnim razgovorima, savetima i sugestijama u vezi laboratorijskog rada i terenskih istraživanja.

Hvala *prof. dr Vladici Simiću*, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu, na pomoći tokom laboratorijskog dela izrade ove teze. Hvala i članovima njegovog tima, kolegama sa Instituta za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu *Simoni, Nataši, Aleksandri, Ani, Neveni, Milošu i Marku* na savetima i prenetim iskustvima iz akvaristike.

Veliko hvala *Slavici Gavrilović i Mariji Todorović*, molekularnim biolozima Zavoda za medicinsku dijagnostiku – Biomedica, Beograd, na strpljenju i nesebičnoj pomoći prilikom pripreme materijala za molekularno genetičke analize.

Posebno hvala kolegama *Margareti Kračun-Kolarević i Vanji Markoviću* na nesebičnoj pomoći, podsticaju u radu i razumevanju. Zahvalnost dugujem i koleginicama sa Odeljenja za hidroekologiju i zaštitu voda *Jeleni Tomović i Katarini Zorić*, na pomoći i razgovorima kada mi je to bilo najpotrebnije, kao i *Božici Vasiljević, Ani Atanacković, Vesni Đikanović i Bojani Tubić* koje su me od samog početka prihvatile kao deo tima. Kolegama *Jeleni Đuknić, Jeleni Čanak Atlagić, Nataši Popović, Maji Raković, Stefanu Anđusu, Nikoli Marinkoviću, Jovani Jovanović Marić, Petru Smiljaniću, Stoimiru Kolareviću, Katarini Jovičić i Jeleni Vranković* zahvalna sam na dobroj saradnji i pozitivnoj energiji u laboratoriji i na terenu.

Hvala koleginicama *Milji i Slavki*, uz čije su drugarstvo doktorske studije, uprkos brojnim obavezama, bile zabavnije.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima na ljubavi, bezrezervnoj podršci i beskrajnom razumevanju. Posebno hvala *majci Miri* koja me je upoznala sa tajanstvenim svetom prirode još u najranijem detinjstvu i *ocu Draganu* koji me je sve ove godine podržavao i ohrabrivao da nastavim školovanje.

Na kraju, hvala mom dragom *Dušku* na beskrajnom razumevanju i strpljenju, na podršci kada god je bilo teško, na društvu i pomoći na terenima. Hvala *Ti* što si mi bio oslonac u svakom trenutku svih ovih godina i što si se radovao svakom mom uspehu.

# Morfološka diferencijacija larvenih stadijuma odabranih vrsta žaba rodova *Rana* i *Bufo* na području Srbije

## Sažetak

Mrke žabe (*Rana dalmatina*, *R. graeca*, *R. temporaria*) i obična krastača (*Bufo bufo*) na području Srbije mogu biti sintopne, a ulaze u vodena staništa samo tokom kratkog reproduktivnog perioda u rano proleće. Punoglavci provode duži vremenski period u vodenim staništima i lakše su uočljivi u odnosu na adulte. Analiza njihove morfologije je jedan od mogućih načina taksonomske identifikacije, naročito u slučajevima kada su genetičke metode nedostupne. Kod nekih vrsta punoglavci na ranim stupnjevima su vizuelno veoma slični, što otežava njihovu identifikaciju na terenu.

Definisani su sledeći osnovni ciljevi: utvrditi osobine spoljašnje morfologije punoglavaca analiziranih vrsta žaba na osnovu kojih se može odrediti njihova taksonomska pripadnost; utvrditi efikasnost primene analiza oblika tela punoglavaca u taksonomskoj identifikaciji; razviti procedure za njihovu pouzdanu, brzu i ekonomičnu taksonomsku identifikaciju. Dodatno, izvršena je taksonomska genetička identifikacija, upoređena je upotreba metoda tradicionalne i geometrijske morfometrije u morfološkoj diferencijaciji ranih larvenih stadijuma, kao i filogenetski i fenetički odnosi analiziranih vrsta.

Iz prirode su sakupljeni punoglavci *R. dalmatina*, *R. temporaria* i *B. bufo* na ranim razvojnim stupnjevima. Taksonomska identifikacija izvršena je DNK barking metodom, primenom 16S *rRNK* markera. Metodama tradicionalne morfometrije je utvrđeno da relativna dužina i širina glave predstavljaju karaktere za razlikovanje rodova *Rana* i *Bufo*, dok je relativna dužina repa karakter za razlikovanje dve vrste mrkih žaba. Detaljnije analize oblika i veličine laboratorijski uspešno odgajanih punoglavaca *R. dalmatina*, *R. temporaria* i *B. bufo* vršene su metodama geometrijske i tradicionalne morfometrije na ranim stupnjevima razvića. Oba pristupa su dala slične rezultate kada su u pitanju kvantifikacija i opis varijabilnosti veličine i oblika. Za razliku od punoglavaca *B. bufo*, punoglavci dve vrste roda *Rana* su sitniji sa manjim telima i repovima dva puta dužim od tela. Kada su poređene dve vrste mrkih žaba, utvrđeno je da punoglavci *R. dalmatina* imaju kraći rep i veće telo. Međutim, suptilne razlike u obliku distalnog dela repa bilo je moguće detektovati samo primenom geometrijske morfometrije.

**Ključne reči:** mrke žabe, obična krastača, taksonomska identifikacija, tradicionalna morfometrija, geometrijska morfometrija, oblik, veličina

**Naučna oblast:** Biologija

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

**UDK:** [575.21+[567.8+591.343]]:57.06 (043.3)

## Morphological differentiation of larval stages of selected anuran *Rana* and *Bufo* species in Serbia

### Abstract

Brown frogs (*R. dalmatina*, *R. graeca*, *R. temporaria*) and common toad (*Bufo bufo*) are anuran species that can be syntopic on the territory of Serbia. They can be found in the aquatic habitats only during short breeding season in the early spring. In contrast, their tadpoles are present for a longer period of time in aquatic habitats and are easy to record. Analysis of tadpole morphology is one of the possible ways for species identification, especially when genetic methods are unavailable. Tadpoles at early developmental stages are visually very similar and thus difficult for identification in the field.

The main objectives of this study were: to determine external tadpole morphological characters that can serve for taxonomic identification; to determine effectiveness of tadpole shape analyses in taxonomic identification; to develop procedures for their reliable, rapid and economic taxonomic identification. In addition, genetic identification was performed, the usage of traditional and geometric morphometric methods for morphological differentiation of tadpoles at early developmental stages was compared and phylogenetic and phenetic relationships of the analyzed species were examined.

Tadpoles at early developmental stages of *R. dalmatina*, *R. temporaria* and *B. bufo* were collected from the field. Taxonomic identification of analyzed species was performed by DNA barcoding, using marker 16S *rRNA*. Traditional morphometrics was applied and the results suggested that relative head length and head width could be good discriminative characteristics for tadpoles of two *Rana* species and *B. bufo*. To distinguish between tadpoles of two analyzed brown frog species, relative tail length could be used. More detailed analyzes of size and shape of successfully laboratory raised *R. dalmatina*, *R. temporaria* and *B. bufo* tadpoles were conducted by comparative (2D landmark-based geometric and traditional) morphometric analyses. Both methodologies produced very similar results considering quantification and description of size and shape variability. Unlike *B. bufo* tadpoles, tadpoles of two *Rana* species were with smaller bodies and tails twice as long as the body. When two species of brown frogs were compared, *R. dalmatina* tadpoles had shorter tails and larger bodies. However, observed subtle shape variation of the distal region of the tail was detected only by geometric morphometrics.

**Key words:** brown frogs, common toad, taxonomic identification, traditional morphometrics, geometric morphometrics, shape, size

**Research area:** Biology

**Area of special interest:** Morphology, systematics and phylogeny of the animals

**UDC:** [575.21+[567.8+591.343]]:57.06 (043.3)

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Teorijske postavke.....	2
1.2. Istorijski pregled istraživanja punoglavaca u svetu i u Srbiji .....	4
1.3. Morfološka varijabilnost i fenotipska plastičnost larvenih stupnjeva bezrepih vodozemaca.....	6
1.3.1. Intraspecijska fenotipska plastičnost.....	6
1.3.2. Fenotipska plastičnost i morfološka evolucija .....	7
1.4. Tradicionalna i geometrijska morfometrija u analizi morfološke varijabilnosti larvenih stupnjeva bezrepih vodozemaca.....	8
1.5. Taksonomska identifikacija analizom spoljašnjih morfoloških karakteristika punoglavaca.....	11
2. CILJEVI STUDIJE .....	14
3. MATERIJAL I METODE.....	16
3.1. Objekat istraživanja.....	17
3.1.1. Vrste roda <i>Rana</i> u Srbiji.....	17
3.1.2. <i>Bufo bufo</i> Linnaeus, 1758.....	22
3.2. Procedure uzorkovanja.....	25
3.3. Procedure gajenja punoglavaca u laboratorijskim uslovima.....	27
3.4. Procedure taksonomske genetičke identifikacije .....	28
3.4.1. Izolacija ukupne DNK iz tkiva.....	29
3.4.2. Uslovi za PCR amplifikaciju željenog fragmenta mtDNK .....	29
3.4.3. Određivanje nukleotidne sekvence dobijenih amplikona.....	30
3.4.4. Filogenetska analiza za identifikaciju vrste organizama i određivanje genetičke distance na osnovu sekvenciranih fragmenata mtDNK .....	30
3.5. Procedure morfološke diferencijacije punoglavaca primenom tradicionalne morfometrije.....	31
3.6. Uporedna (geometrijska vs. tradicionalna) morfometrijska analiza varijabilnosti punoglavaca .....	32
3.6.1. Metode geometrijske morfometrije .....	32
3.6.2. Metode tradicionalne morfometrije.....	34



4. REZULTATI.....	36
4.1. Taksonomska genetička identifikacija i genetička varijabilnost .....	37
4.1.1. Filogenetska analiza .....	37
4.1.2. Inter- i intraspecijske genetičke distance.....	40
4.2. Morfološka diferencijacija punoglavaca .....	41
4.2.1. Morfološka diferencijacija punoglavaca primenom metoda tradicionalne morfometrije .....	41
4.2.2. Geometrijska vs. tradicionalna morfometrijska analiza varijabilnosti veličine i oblika tela punoglavaca .....	46
4.2.2.1 Rezultati dobijeni primenom geometrijske morfometrije .....	46
4.2.2.2 Rezultati dobijeni primenom tradicionalne morfometrije .....	48
5. DISKUSIJA.....	52
5.1. Taksonomska genetička identifikacija i genetička varijabilnost mrkih žaba ( <i>Rana</i> sp.) i obične krastače ( <i>B. bufo</i> ) na području Srbije .....	53
5.2. Pregled spoljašnjih morfoloških karaktera ranih larvenih stadijuma mrkih žaba (rod <i>Rana</i> ) i <i>B. bufo</i> sa teritorije Srbije koji najviše doprinose njihovoj taksonomskoj identifikaciji .....	54
5.3. Efikasnost primene metoda tradicionalne i geometrijske morfometrije u morfološkoj diferencijaciji ranih larvenih stadijuma kod sintopnih populacija mrkih žaba (rod <i>Rana</i> ) i <i>B. bufo</i> na teritoriji Srbije.....	55
5.4. Varijabilnost oblika punoglavaca: uticaj filogenetskih ograničenja i sredinskih faktora .....	56
6. ZAKLJUČCI.....	58
7. LITERATURA.....	60
8. PRILOZI .....	79

# **1. UVOD**

## 1.1. Teorijske postavke

Bezrepi vodozemci (Anura) ili žabe predstavljaju grupu kičmenjaka koju odlikuje izuzetna morfološka, ekološka i reproduktivna raznovrsnost. Većina vrsta ima složeni, bifazni životni ciklus sa ekološki i morfološki različitim životnim stupnjevima (McDiarmid i Altig, 1999; Handrigan i Wassersug, 2007). Akvatične larve (punoglavci) i metamorfozirane terestrične juvenilne jedinke se razlikuju u mnogo bioloških aspekata, uključujući stanište, način ishrane, ponašanje, fiziologiju, a morfološke razlike su posebno uočljive. Na ovaj način, larvene i suvozemne forme žaba ne dolaze u kompeticiju za hranu i stanište i podležu različitim selektivnim pritiscima.

Za razliku od larvi ostalih grupa vodozemaca (repati vodozemci - Urodela i beznogi vodozemci - Gymnophiona), larve žaba su najspecijalizovanije i ujedno najrazličitije od adultnih jedinki iste vrste i nazivaju se „punoglavci” (Duellman i Trueb, 1994). Punoglavac nije samo produžetak embrionske faze koja se završava metamorfozom, već je visoko specijalizovani stupanj kompleksnog životnog ciklusa žaba. Punoglavac se hrani i raste, a zatim se preobražava u suvozemni juvenilni oblik koji po dostizanju polne zrelosti može da učestvuje u reprodukciji (Duellman i Trueb, 1994; McDiarmid i Altig, 1999).

Suvozemne juvenilne forme žaba naseljavaju širok areal terestričnih i slatkovodnih staništa, telo im je kompaktno sa dobro razvijenim udovima i nemaju rep. Punoglavci su jedinstvenog oblika u odnosu na sve druge akvatične kičmenjake, a imaju i svojstvene odlike ponašanja i morfologije. Larve bezrepih vodozemaca su vezane za akvatičnu ili veoma vlažnu sredinu, a karakteriše ih kratko, okruglasto telo, bez bočnih peraja i relativno dugačak, mišićav, fleksibilan rep. Rep je lateralno spljošten sa uočljivom centralnom osom kaudalne muskulature i dorzalnim i ventralnim „perajem”. Kod punoglavaca „perajem” ili „perajnim naborom” koji obično prelazi dužinu dorzalne i ventralne ivice repnog mišića, naziva se kaudalna (repna) kresta, zalistak bez skeletne potpore izgrađen od sloja vezivnog tkiva i epidermisa (McDiarmid i Altig, 1999). Ventralno „peraje” počinje od analnog otvora i proteže se do vrha repa, dok dorzalno „peraje” počinje od sredine ili zadnjeg dela tela i proteže se do vrha repa. Oblik i veličina dorzalnog i ventralnog „peraja” može veoma da varira. Telo punoglavca je blago izbočeno. Oči su bez kapaka, nozdrve su široke, a usta su veoma varijabilne forme i oblika. Usta sadrže tzv. keratinozni kljun (engl. *horny beak*) u kome je nekoliko redova labijalnih, keratinoznih zubića iza kojih se nastavlja bukofaringealna šupljina. Punoglavci u odnosu na adulte imaju različit digestivni sistem. Neki autori ih smatraju visoko specijalizovanim herbivorima (filtriraju fitoplankton i perifiton), ali je zabeleženo da se hrane i malim akvatičnim organizmima ili čak i larvama drugih vodozemaca, a kod nekih punoglavaca je uočen i povremeni kanibalizam (Duellman i Trueb, 1994; Ambrogio i Mezzadri, 2014). Punoglavci imaju dugačko crevo čija površina služi za apsorpciju nutrijenata, a u nerazvijenom želucu se nalazi žlezda (engl. *manicotto gland*) čije lučenje potpomaže digestiju hrane. Rano u razvoju, punoglavci imaju spoljašnje škrge, ispred kojih se nalazi kožni nabor. Operkularni nabor ili „operkulum” je kožni nabor koji raste i zatvara škrge u „operkularnu” odnosno škržnu komoru. Ova komora je sa spoljašnjom sredinom povezana tvorevinom u obliku levka, tzv. „spirakulumom”, čiji broj i pozicija mogu da variraju od vrste do vrste (Duellman i Trueb, 1994). Kod punoglavaca „spirakulum” se formira srastanjem operkularnog nabora sa telesnim zidom i nije homolog spirakulumu koji se javlja kod riba (Gnathostomata). Termini „operkulum” i „spirakulum”

su se veoma dugo koristili kod punoglavaca i njihova upotreba se zadržala da bi se izbeglo uvođenje novih termina koji bi stvarali dodatnu zabunu (McDiarmid i Altig, 1999).

Kod žaba, larvena faza počinje izleganjem iz jaja, a završava se metamorfozom. Izleganje traje kratko i razlikuje se od stadijuma embriona (intrakapsularni stadijum) i larve (stadijum na kom je punoglavac mobilan i hrani se). Stadijum tek izlegle jedinke (engl. *hatchling*) se može smatrati prelaznim stadijumom između embriona i prave larve, jer je kretanje na ovom stupnju veoma redukovano i jedinka nije sposobna da uzima hranu iz okruženja. Žlezda na donjem delu glave (engl. *adhesive gland*) luči lepljivi sekret kojim se jedinka pričvršćuje za ostatke jaja i hrani se ostacima žumanca. Faza prave larve počinje formiranjem digestivnog sistema (otvaranje usnog otvora, prisustvo oralnog diska sa malim papilama, labijalnim zubima i mandibulom) kada jedinka počinje aktivno da pliva i traži hranu, a telo i rep rastu. Gosner (Gosner, 1960) je na osnovu morfoloških promena opisao razviće punoglavaca. Faza do metamorfoze uglavnom traje od 25. do 35. Gosnerovog stupnja (Gosner, 1960). Zadnji ekstremiteti se pojavljuju pre prednjih, u vidu „pupoljaka” (engl. *buds*) na zadnjoj strani tela. Razvijaju se horizontalno, u pravcu repa, što održava hidrodinamični oblik tela punoglavca tokom larvalne faze. Udovi postaju funkcionalni pred metamorfozu, kada jedinka počinje da izlazi iz vodene sredine. Pojavom zadnjih udova koji relativno brzo rastu, punoglavac ulazi u pro-metamorfoznu fazu (stupanj 36. do 41. prema Gosneru, 1960). Pre- i prometamorfozna faza su najduže faze tokom kojih punoglavac dostiže svoju maksimalnu veličinu. Prednji ekstremiteti se razvijaju unutar škržne komore i probijaju telesni zid neposredno pre završetka metamorfoze. Pojava prednjih nogu obeležava početak klimaksa metamorfoze (42. do 46. stadijuma prema Gosneru, 1960; engl. *metamorph*), kada se kod larve dešavaju morfološke i funkcionalne promene koje vode do fenotipa metamorfozirane juvenilne žabe (engl. *froglet*) (Duellman i Trueb, 1994; McDiarmid i Altig, 1999).

Etkin (1932) je definisao tri morfološke faze kod larvi vodozemaca: 1. premetamorfozu koju karakteriše značajan rast i razvoj larvenih struktura, ali bez metamorfoznih promena; među vodozemcima ova faza je jedinstvena za žabe; 2. prometamorfozu koja predstavlja period kontinuiranog rasta, pogotovu udova i inicijacije manjih promena i 3. klimaks tokom koga dolazi do radikalnih promena koje kulminiraju gubitkom većine larvenih struktura. Kod Anura ovaj period počinje skraćivanjem repa, a završava se njegovom potpunom resorpcijom. Metamorfoza može biti definisana kao niz naglih postembrionskih promena u koje spadaju promene u strukturi, fiziologiji, biohemiji i odlikama ponašanja. Tokom metamorfoze vodozemaca odigravaju se tri velike promene: 1. regresija struktura i funkcija koje su značajne samo za larveni stadijum; 2. transformacija larvalnih struktura u formu koja je odgovarajuća za upotrebu kod adulta i 3. razvoj struktura i funkcija koje su potpuno nove i esencijalne za adulta. Svi procesi rasta i metamorfoze kod larvi Anura su pod kontrolom hormona (Duellman i Trueb, 1994).

Morfološki i ekološki različite larve Anura adaptirane su za opstanak u različitim tipovima vodenih staništa, a upravo ta njihova raznovrsnost je imala veliku ulogu u radijaciji žaba (Duellman i Trueb, 1994). Različite strategije životne istorije kod larvi bezrepih vodozemaca nastaju uticajem različitih ekoloških faktora koji na njih deluju selektivno (Miaud i sar., 1999; Morrison i Hero, 2003) i utiču na genotip da produkuje što uspešniju životnu strategiju, odnosno fenotipsku plastičnost (Sarasola-Puente i sar., 2011; Johansson i Richter-Boix, 2013), kako kod različitih vrsta, tako i kod različitih populacija iste vrste (Sarasola-Puente i sar., 2011).

Ekološki faktori veoma utiču na vreme i dužinu razvića punoglavaca (Garriga i Llorente, 2012). Altig i Johnston (1989) zastupaju mišljenje da je moguće ustanoviti opšte morfološke obrasce koji su povezani sa specifičnim staništima i načinima ishrane kod punoglavaca. Studije koje se bave izučavanjem fenotipske evolucije punoglavaca u okviru istog životnog stupnja pokazuju da je njihova morfološka raznovrsnost usko povezana i sa lokomotornom specijalizacijom (Sherratt i sar., 2017). U mnogim istraživanjima je utvrđeno da ne samo eksterna (spoljašnja), već i interna (unutrašnja) morfologija punoglavaca može biti povezana sa njihovom ekologijom (Wassersug, 1980; Satel i

Wassersug, 1981; Hall i sar., 2002; Alcalde i Rosset, 2003; Vera Candiotti i Haas, 2004; Vera Candiotti i sar., 2004; Vera Candiotti, 2005, 2006).

Brojni fizički faktori (udaljenost od obale, koncentracija kiseonika, kvalitet supstrata, dubina vode i brzina toka, temperatura), kao i biološki (karakteristike vrste, populaciona gustina, prisustvo punoglavaca drugih vrsta žaba ili prisustvo druge vrste uopšteno, prisustvo i raspored vegetacije) mogu uticati na prostorni i vremenski raspored punoglavaca u mikrostaništima. Neka staništa imaju stabilnije sredinske uslove, dok su druga veoma podložna promenama temperature i količine kiseonika, što može uticati na punoglavce koji se nalaze u različitim akvatičnim staništima, kao i na njihovo ponašanje. Temperatura veoma utiče na ponašanje, stopu rasta i ekologiju punoglavaca (Duellman i Trueb, 1994), kao i na aktivnost, rast, razvoj, stopu metabolizma i vreme metamorfoze (McDiarmid i Altig, 1999). Populacije iste vrste koje naseljavaju različite geografske regione mogu se razlikovati u brzini rasta i dužini života (Eaton i sar., 2005). Brz rast i razvoj su posebno bitni za vrste koje žive u efemernim staništima, poput pustinja gde bare brzo presušuju ili na visokim nadmorskim visinama gde su bare podložne zamrzavanju. Na primer, kod populacija vrste *R. temporaria* koje naseljavaju staništa oskudna vodom larvena faza može da traje i samo 15 dana (McDiarmid i Altig, 1999).

Kod većine vrsta žaba punoglavci žive zajedno, u agregatima. Grupisanje u agregate može biti posledica zadovoljavanja različitih potreba poput traženja hrane, odgovora na sredinske uslove, ali i pojave visokoorganizovanih socijalnih interakcija kod nekih vrsta (Lescure, 1968). Wassersug (1973) je klasifikovao agregate punoglavaca u dve široke kategorije: jednostavne agregate koji se formiraju usled biotaksisa i agregate koji se formiraju na osnovu biosocijalnih interakcija (tzv. „škole”). Smatra se da se grupisanjem u agregate punoglavci štite od predatora ili lakše dolaze do hrane (Duellman i Trueb, 1994).

Stopa preživljavanja punoglavaca je usko povezana sa prisustvom predatora koji mogu biti i beskičmenjaci i kičmenjaci. Kod nekih vrsta se javlja kanibalizam kada punoglavci jedu jaja i tek izlegle larve istih i/ili drugih vrsta žaba. Ova pojava se smatra češćom nego što je zabeleženo, i posebno kod punoglavaca onih vrsta žaba koje polažu jaja u malim, efemernim barama (McDiarmid i Altig, 1999; Ambrogio i Mezzadri, 2014).

Rezultati ekoloških, morfoloških i fizioloških studija punoglavaca imaju veliku primenu u taksonomiji, filogeniji i ontogeniji (Duellmann i Trueb, 1994; Larson 2002, 2004, 2005; Haas, 2003; Grosjean, 2005; Vejarano i sar., 2006; Garriga i Llorente, 2012), životnoj istoriji (Thomas i sar., 2005) i evoluciji bezrepih vodozemaca (Roelants i sar., 2011; Priti i sar., 2015; Sherratt i sar., 2017), a u novije vreme i u konzervacionoj biologiji (Van Buskirk, 2009; Severtsova i sar., 2012; Pujol-Buxó i sar., 2013; Schulze i sar., 2015).

## 1.2. Istorijski pregled istraživanja punoglavaca u svetu i u Srbiji

Prvi poznati zapisi o larvama bezrepih vodozemaca pojavili su se u XVI veku, kada je u svom delu „*Historiari Animalium*” Gesner (1551 – 1604) dao ilustrovani prikaz adulta i juvenilnog oblika žabe. Istorijski važnu studiju životne istorije evropskih žaba i prvi prikaz razvića razvojnih stupnjeva nekoliko evropskih vrsta, od jaja do adulta, dao je Rösel von Rosenhof (1753 – 1758), a u sličnom periodu razvojem punoglavaca se bavio i Hutchinson (1796). Najraniju sliku i opis usnog aparata punoglavca dao je Swammerdam (1737 – 1738), a gotovo vek kasnije delove usnog aparata opisao je Saint-Ange (1831). Dugés (1834) je u svojoj komparativnoj studiji o osteologiji i miologiji vodozemaca opisao i delimično ilustrovao delove usnog aparata larvi. Razvoj labijalnih zubića vilice izučavao je Vogt (1842), a Van Bambeke (1863) je u svom istraživanju prvi koristio osobine punoglavaca (uključujući i delove usnog aparata) kao taksonomske karaktere i uočio razlike između evropskih vrsta. Sledi nekoliko radova o varijabilnosti usnog aparata kod različitih vrsta evropskih žaba (Leydig, 1876; Lataste, 1879; Keiffer, 1888; Schulze, 1888; Gutzeit, 1889). U svojim istraživanjima Héron-Royer i Van Bambeke (1881, 1889) opisuju i upoređuju strukturu delova usnog aparata kod 22 vrste

punoglavaca i ističu da su osobine punoglavaca značajne i na nivou roda i familije. Boulenger (1892) usvaja dotadašnja saznanja i u svom radu naglašava značaj pozicije spirakuluma i analnog otvora kao bitnih karakteristika za razlikovanje vrsta. Takođe, smatra da bi u opise punoglavaca trebalo uključiti obrasce pigmentacije i predlaže korišćenje formule redova labijalnih zubića (engl. *labial tooth row formula*) za identifikaciju jedinki. Boulenger (1892) objedinjuje svoja istraživanja i publikuje ključ za 19 vrsta evropskih vodozemaca. U svom radu daje ilustracije punoglavaca i delova usnog aparata, gde je opisivao samo ono što je nazvao „zreli punoglavac”, dok se tek kasnije izučavaju i svi ostali stupnjevi razvoja punoglavaca i njihova morfologija.

U XIX veku se javlja interesovanje za punoglavce i u Severnoj Americi. Izučavajući punoglavce države Masačusets, Hinckley (1881) je opisala i uporedila delove usnog aparata sedam vrsta punoglavaca. Larvama bezrepih vodozemaca bavio se i Wright (1914, 1932). Orton (1952) je sumirala osobine punoglavaca i potom napisala ključ za rodove koji naseljavaju Sjedinjene Američke Države (SAD) i Kanadu, a dve decenije kasnije Altig i Brandon (1971) publikuju rad slične sadržine o punoglavcima Meksika. Altig je publikovao ključ za 72 vrste iz SAD i Kanade (Altig, 1970), kao i još jedan za 100 vrsta iz Meksika (Altig, 1987).

Orton (1953) je prema strukturi škržne komore, njenog otvora i tipa usnog aparata, razvrstala punoglavce u četiri tipa (Duellman i Trueb, 1994). Ubrzo publikuje rad u kome na osnovu unutrašnjih i spoljašnjih karakteristika anatomije razvrstava oko 600 vrsta žaba u osnovna četiri larvena tipa, pri čemu izučava i obrasce njihove adaptivne radijacije (Orton, 1953). Kasnije, Orton (1957) širi svoje ideje i zagovara korišćenje larvenih karakteristika u rekonstrukciji filogenije žaba. Iako su kritikovani određeni aspekti larvenih kategorija koje je Orton odredila, Starrett (1973) formalizuje ove grupe u četiri taksonomske kategorije: tip 1 - Xenonura, tip 2 - Scoptanura, tip 3 - Lemmanura i tip 4 - Acosmanura, i prikazuje evolutivni scenario njihovih pretpostavljenih odnosa. Altig i Johnston (1986) su izučavali morfološke karakteristike punoglavaca iz celog sveta, a potom su prikazali šemu ekomorfoloških grupacija (engl. *guilds*) na osnovu koje se jasno sumira morfološki diverzitet punoglavaca u smislu adaptacija (Altig i Johnston, 1989).

Širenje i dopunjavanje saznanja o punoglavcima podstiče dalje interesovanje i proučavanje, te početkom 1970-ih sve više naučnika počinje da istražuje njihovu biologiju. Tako su publikovani radovi o funkcionalnim i evolucionim aspektima morfologije punoglavaca, uključujući studije bukalnih struktura, kinetike plivanja i ekologije ishrane (Wassersug, 1976, 1980; Wassersug i Hoff, 1985; Lannoo i sar., 1987). Slede dve veoma bitne publikacije koje se bave strukturom i dinamikom zajednice larvi vodozemaca (Wilbur, 1972) i ekološkim aspektima metamorfoze vodozemaca (Wilbur i Collins, 1973). Konačno, sva dotadašnja istraživanja o larvama bezrepih vodozemaca sumiraju Duellman i Trueb (1986).

Istraživanja punoglavaca u Srbiji su bila prilično skromna. U svojoj publikaciji, Sidorovska i sar. (2002) se bave poređenjem alopatričkih i simpatričkih populacija punoglavaca vrsta *Pelobates fuscus* i *P. syriacus* sa lokaliteta u Makedoniji i Srbiji. Primenom tradicionalne morfometrije i multivarijantnih analiza nije se dobila diskriminacija između dve analizirane vrste, naročito u zoni simpatrije. Autori zaključuju da se ova metoda ne može koristiti za identifikaciju vrsta, osim na veoma ranim larvenim stupnjevima.

### 1.3. Morfološka varijabilnost i fenotipska plastičnost larvenih stupnjeva bezrepih vodozemaca

Kod punoglavaca postoji velika intra- i interspecijska morfološka varijabilnost koja potiče od niza promena kroz koje punoglavci prolaze od svog izleganja do metamorfoze (Grosjean, 2005; Sherratt i sar., 2018). Ekološki faktori doprinose morfološkoj raznovrsnosti punoglavaca (Grosjean, 2005; Sherratt i sar., 2018), ali se smatra da je varijabilnost oblika tela kod različitih vrsta žaba nasledna i da se javlja rano u razviću (Strauss i Altig, 1992). Varijabilnost morfoloških karakteristika punoglavaca tokom razvića bila je predmet mnogih istraživanja (Strauss i Altig, 1992; Sidorovska i sar., 2002; Grosjean, 2005; Handrigan i Wassersug, 2007; Garriga i Llorente, 2012; Severtsova i sar., 2012; Sayed i sar., 2016; Sherratt i sar., 2017).

Sposobnost organizma da reaguje na sredinski pritisak promenom u svojoj formi, stanju ili nivou aktivnosti se naziva fenotipska plastičnost (West-Eberhard, 2003). Takođe, fenotipska plastičnost može da se definiše i kao kapacitet genotipa da obrazuje različite fenotipove kao odgovor na varijabilne sredinske uslove (Pigliucci, 2001). Kao odgovor na stalne promene u spoljašnjoj sredini, organizmi su razvili brojne strategije kako bi proizveli adaptivnu fenotipsku plastičnost/ varijabilnost (Meyers i Bull, 2002). Iako nije svaka plastičnost adaptivna (Ghalambor i sar., 2015), „adaptivna plastičnost” odnosno plastičnost koja povećava adaptivnu vrednost jedinke (engl. *fitness*) (Via i sar., 1995), omogućava jedinkama da odgovore na promene u spoljašnjoj sredini tako što ispoljavaju fenotipove koji su selektivno favorizovani dominantnim uslovima, čak i kada se ti uslovi nepredvidivo menjaju (Via i sar., 1995; West-Eberhard, 2003). Pitanje porekla i diverzifikacije novih, kompleksnih fenotipova je jedno od otvorenih pitanja u evolucionoj biologiji (Mayr, 1959; Moczek, 2008; Wagner i Lynch, 2010). Ranije se smatralo da novi fenotipovi nastaju isključivo genetičkim promenama (Carroll, 2008), ali se fenotipske promene nastale usled uticaja okruženja smatraju jednim od mogućih načina nastanka inicijalne novine (npr. Price i sar., 2003; West-Eberhard, 2003; Badyaev, 2005; Pigliucci i sar., 2006; Lande, 2009; Pfennig i sar., 2010; Moczek i sar., 2011; Schlichting i Wund, 2014; Laland i sar., 2015; Susoy i sar., 2015; Levis i Pfennig, 2016, 2018).

#### 1.3.1. Intraspecijska fenotipska plastičnost

Intraspecijska morfološka varijabilnost punoglavaca je odgovor jedinke na spoljašnje faktore i nastaje delovanjem različitih mehanizama. Fenotipska plastičnost i različiti procesi koji izazivaju genetičke promene u okviru populacija (Van Buskirk i McCollum, 1999; Pfennig i Murphy, 2000; Relyea, 2004, 2005) su prirodni izvori intraspecijske varijabilnosti. Promene u spoljašnjoj sredini deluju na jedinku koja se u njoj nalazi izazivajući ispoljavanje alternativnog fenotipa radi opstanka u novonastalim uslovima, odnosno dolazi do fenotipske akomodacije (West-Eberhard, 2003). Ukoliko postoji i genetička varijabilnost koja omogućava da jedinke ispolje različit nivo odgovora na promene u okruženju, onda prirodna selekcija može da deluje na tu varijabilnost i poboljša funkcionalnost/ uspešnost novog fenotipa. Zavisno od toga da li plastičnost omogućava adaptivnu prednost, selekcija može da favorizuje: ili povećanu osetljivost jedinke na promene u okruženju kada kao rezultat nastaje novi fenotip koji je deo polifenizma ili smanjenu osetljivost na te promene, u kom slučaju je plastičnost osobine izgubljena i fenotip postaje kanalisani, odnosno dolazi do genetičke asimilacije (Waddington, 1953). Do genetičke asimilacije može doći zbog dva razloga: 1- kada je plastičnost „skupa” za jedinku (Snell-Rood i sar., 2010; Murren i sar., 2015) selekcija će je eliminisati i doći će do kanalisanosti favorizovanog fenotipa; 2- plastičnost se gubi usled mutacije ili genetičkog drifta (Masel i sar., 2007).

Punoglavci su tokom razvića pod uticajem raznovrsnih biotički i abiotički selektivnih pritisaka koji u kombinaciji sa specifičnim karakteristikama životne istorije vrste oblikuju njihovu morfologiju (Relyea, 2004; Richter-Boix i sar., 2006a, b, 2007; Touchon i Warkentin, 2008; Van Buskirk, 2009; Vukov i sar., 2018). Morfološke karakteristike punoglavaca su u pozitivnoj korelaciji sa adaptivnom vrednošću

jedinki tokom larvalnih stupnjeva (Johnson i sar., 2008; Dijk i sar., 2016; Pujol-Buxó i sar., 2017), a utiču i na morfologiju i adaptivnu vrednost jedinke i nakon metamorfoze (Tejedo i sar., 2010; Johansson i Richter-Boix, 2013; Pujol-Buxó i sar., 2013). Spoljašnji faktori koji najviše utiču na populacije punoglavaca su prisustvo predatora i tip vodenog staništa (efemerno ili permanentno) (Pujol-Buxó i sar., 2017).

### 1.3.2. Fenotipska plastičnost i morfološka evolucija

Gubitak plastičnosti, tj. „genetička asimilacija” (Waddington, 1953) se smatra važnim faktorom u procesu nastanka novih osobina, čak i novih vrsta (Pfennig i sar., 2010; Moczek i sar., 2011). Bez obzira da li je došlo do polifenizma ili genetičke asimilacije, ključno je da prirodna selekcija može da deluje na sredinski-indukovan fenotip i tako unapredi adaptivne promene u formi i/ili regulaciji tog fenotipa (Pfennig i Pfennig, 2012). Zbog činjenice da alternativni fenotipovi mogu dovesti do kanalisnosti osobine kroz genetičku asimilaciju, na ovaj način može doći i do reproduktivne izolacije (Pfennig i McGee, 2010), odnosno plastičnost može da doprinese specijaciji i adaptivnoj radijaciji vrste (pregledno u Pfennig i sar., 2010; Wund, 2012; Schneider i Meyer, 2017). Neki istraživači su zapazili da plastičnost može da dovede i do fenotipske divergencije između vrsta (Liem i Kaufman, 1984), te da tako može da doprinese i velikim evolutivnim („makroevolutivnim”) promenama (Pigliucci i Murren, 2003; Jablonski, 2017).

Plastičnost može imati ulogu u nastanku evolutivnih novina putem mehanizma primarne evolucije plastičnosti (engl. *plasticity-first evolution*, PFE - Schwander i Leimar, 2011; Levis i Pfennig, 2016) odnosno svojstva da povećava adaptivnu vrednost jedinke u stresnim uslovima (Schmalhausen, 1949; Badyaev, 2005; Ghalambor i sar., 2015). Evolucija primarne plastičnosti ima dve faze: 1 – fenotipska akomodacija u kojoj je novi fenotip indukovan i prečišćen, 2 – genetička akomodacija kada selekcija genetičkim procesima favorizuje adaptivni/prečišćen oblik indukovano fenotipa kroz generacije. Ovaj proces (PFE) nastaje u slučajevima: 1 - kada promena u spoljašnjoj sredini dovede do ispoljavanja novog fenotipa usled postojanja fenotipske plastičnosti jedinke, 2 - različiti genotipovi variraju u tendenciji i/ili načinu odgovora na ove sredinske promene, 3 - selekcija favorizuje različite odgovore, a samim tim i genotipove, čime dolazi do evolucije fenotipske plastičnosti, 4 - kroz ove procese, predpostojeća fenotipska plastičnost (engl. *preexisting phenotypic plasticity*) je konačno oblikovana prirodnom selekcijom u kompletno/potpuno funkcionalni fenotip (West-Eberhard, 2003; Moczek i sar., 2011; Levis i Pfennig, 2016; Levis i sar., 2018). Levis i sar. (2018) su analizirali punoglavce srodnih vrsta Scaphiopodidae (*Scaphiopus holbrookii*, *Spea multiplicata* i *Sp. bombifrons*) kako bi pokazali da različite linije ovih žaba predstavljaju različite stupnjeve u evoluciji karnivornog morfotipa. Za predstavnika predačke fenotipske karakteristike korišćeni su punoglavci vrste *Sc. holbrookii* koji su isključivi omnivori, ne ispoljavaju polifenizam, a vrsta je ekološki veoma slična vrstama roda *Spea*. Kod punoglavaca vrsta roda *Spea* javlja se polifenizam (omnivori i karnivori), a dalje preoblikovanje kroz genetičku asimilaciju se javlja kod punoglavaca vrste roda *Sp. bombifrons* koji u simpatriji sa punoglavcima vrste *Sp. multiplicata* sekundarno gube polifenizam karnivor-omnivor i postaju gotovo isključivi karnivori. Rezultati koje su dobili Levis i sar. (2018) podržavaju postojanje PFE i sugerišu da fenotipska plastičnost zaista doprinosi nastanku evolutivnih novina. Takođe, pokazali su da je fenotipska plastičnost predačkog predstavnika verovatno bila prisutna u trofičkim karakteristikama kao i u ekspresiji gena i da su ove karakteristike bile adaptivno preoblikovane te su generisale evolutivnu novinu – prepoznatljivu karnivornu morfologiju – koja omogućava punoglavcima roda *Spea* da nasele nove niše. Iako je smatrano da se PFE i mutacija međusobno isključuju prilikom formiranja novina, autori su pokazali da ova dva mehanizma deluju sinergistički. Tokom evolucije karakterističnog karnivornog morfotipa, kombinacijom PFE i takson-specifičnih mutacija dobijen je koordinisani adaptivni odgovor (Levis i sar., 2018).



#### **1.4. Tradicionalna i geometrijska morfometrija u analizi morfološke varijabilnosti larvenih stupnjeva bezrepih vodozemaca**

Morfometrija se može definisati kao „istraživanje problema veličine i oblika morfoloških celina korišćenjem statističkih metoda, po pravilu različitih multivarijantnih procedura, na osnovu podataka dobijenih merenjima” (Rohlf, 1990). Morfometrija, pored podataka o veličini i obliku, omogućava dobijanje opšte „slike”, i obrazaca morfološke varijabilnosti, a potom i „principa” promena morfoloških celina, odnosno mogućih procesa i mehanizama koji dovode do promena morfoloških celina (Ivanović i Kalezić, 2013). U morfometriji postoje dva pristupa - tradicionalna i geometrijska morfometrija - i oba nalaze primenu u studijama morfološke varijabilnosti punoglavaca.

##### **Tradicionalna (linearna) morfometrija**

Tradicionalna morfometrija čini spoj kvantitativne morfologije i multivarijantnih statističkih metoda. Podaci se dobijaju merenjem spoljašnjih morfoloških celina (Oxnard, 1978), najčešće dužinskih karakteristika (morfometrijskih varijabli), kao i merenjem rastojanja između jasno definisanih specifičnih tačaka (engl. *landmarks*). Specifične tačke su jasno definisane anatomske tačke, koje je moguće sa velikom preciznošću i ponovljivošću odrediti kod svih jedinki u analiziranom uzorku. Specifične tačke se često u literaturi nazivaju homologim tačkama (termin koji je uveo Bookstein, 1991), ali zbog moguće zabune do koje dovodi upotreba samog termina homologija, kao i zbog toga što odabrane specifične anatomske tačke u osnovi ne moraju biti homologe tačke, termin specifične tačke se smatra odgovarajućim (detaljnije u Zelditch i sar., 2012; Ivanović i Kalezić, 2013).

Metode tradicionalne morfometrije su primenjivane u studijama morfološke varijabilnosti punoglavaca u zavisnosti od staništa. Sidorovska i sar. (2002) su utvrdili da kod larvenih stupnjeva dve vrste (*Pelobates fuscus* i *P. syriacus*) stanište ima veliki uticaj na intraspecijsku varijabilnost, a da su interspecijske razlike u veličini glave mnogo veće među punoglavcima na ranijim stupnjevima razvoja. Na kasnijim stupnjevima morfologija ovih vrsta punoglavaca konvergira, te je njihova identifikacija otežana (Sidorovska i sar., 2002). Linearna morfometrija je primenjivana i za procenu variranja morfoloških karakterata tokom ontogenije. Grosjean (2005) je analizirao punoglavce vrste *Rana (Sylvirana) nigrovittata* kao model organizme. Koristio je morfometrijske linearne mere spoljašnjih oralnih i unutrašnjih bukalnih karakterata i utvrdio da većina morfoloških karakteristika tela/glave dobro opisuju oblik punoglavaca i malo variraju između jedinki, dok su mere repa i oralnog diska bile manje pouzdane. Grosjean (2005) zaključuje da se svi karakteri potencijalno mogu koristiti u taksonomiji ili filogeniji i da posebnu pažnju treba obratiti na visoko varijabilne osobine kako bi se upotpunio opis oblika.

##### **Geometrijska morfometrija**

Metode geometrijske morfometrije pružaju mogućnost odvojenog analiziranja varijabilnosti veličine i oblika morfoloških celina, primenom uni- i multivarijantnih statističkih metoda, kao i grafičko predstavljanje varijabilnosti oblika (Ivanović i Kalezić, 2013). Morfološke celine se istražuju na novi način, preko njihove geometrije (Rohlf, 2000; Adams i sar., 2004), pri čemu se polazi od rasporeda specifičnih tačaka u dve ili tri ravni prostora, odnosno geometrijskih odnosa varijabli (Monteiro, 1999; Monteiro i sar., 2000; Klingenberg, 2002).

U geometrijskoj morfometriji, oblik morfološke celine određuju geometrijske informacije nakon isključivanja efekata njegove veličine, položaja i orijentacije u prostoru (Kendall, 1977), odnosno u matematičkom pogledu, oblik morfološke celine se definiše kao skup geometrijskih informacija koje su nepromenljive u odnosu na skaliranje, translaciju i rotaciju (Klingenberg i Monteiro, 2005). Najčešće primenjivana procedura u savremenim studijama geometrijske morfometrije koja za cilj ima uklanjanje efekata veličine, položaja i orijentacije, jeste Generalizovana Prokrustova analiza (engl.

*General Procrustes Analysis* – GPA) (Rohlf i Slice, 1990; Dryden i Mardia, 1998; Rohlf, 1999), odnosno Prokrustova superimpozicija (poravnavanje). Prokrustove koordinate (engl. *Procrustes coordinates*) koje predstavljaju koordinate specifičnih tačaka nakon Prokrustove superimpozicije, nose informacije o obliku analizirane morfološke celine i predstavljaju varijable oblika i polazne podatke za dalje analize varijabilnosti oblika (Dryden i Mardia, 1998). Linearna mera razlike u obliku između konfiguracija koje se porede označava se kao Prokrustova distanca (engl. *Procrustes distance*) i predstavlja osnovnu meru razlika u obliku u geometrijskoj morfometriji (Bookstein, 1991).

Veličina centroida (engl. *centroid size* – CS) se koristi kao geometrijska mera veličine nekog objekta opisanog konfiguracijom specifičnih tačaka. Veličina centroida predstavlja meru disperzije specifičnih tačaka od središta (centroida) date konfiguracije (Bookstein, 1991) i njena vrednost zavisi od broja i rasporeda specifičnih tačaka. Ukoliko je odsutna alometrija (promene oblika povezane sa promenama u veličini morfoloških celina), CS predstavlja meru veličine nezavisnu od oblika (Zelditch i sar., 2012; Ivanović i Kalezić, 2013).

Specifična odlika geometrijske morfometrije je njena velika „statistička osetljivost”, odnosno primenom geometrijske morfometrije mogu se otkriti male promene u obliku morfoloških celina koje se ne mogu utvrditi metodama tradicionalne morfometrije (Klingenberg, 2002). Geometrijska morfometrija može biti korisna u rešavanju brojnih taksonomskih, evolucionih i ekoloških nedoumica, a njen razvoj usko je povezan sa razvojem novih tehnologija (prvenstveno softvera), zbog čega pokazuje tendenciju konstantnog usavršavanja (Jojić, 2010).

Geometrijska morfometrija nalazi primenu u analizi morfološke varijabilnosti različitih grupa životinja, među kojima i vodozemaca (Ivanović i sar., 2009, 2011; Lawing i Polly, 2010; Kaliontzopoulou, 2011; Cvijanović i sar., 2014). U studijama morfološke varijabilnosti bezrepih vodozemaca (Sherratt i sar., 2017; Vukov i sar., 2018) posebno su interesantna istraživanja punoglavaca (Larson, 2002, 2004, 2005; Vera Candioti, 2006; Arendt, 2010; Sherratt i sar., 2017, 2018). Metode geometrijske morfometrije se često koriste i kao dopuna u studijama koje se bave rasvetljavanjem filogenetskih odnosa bezrepih vodozemaca (Larson i de Sá, 1998; Maglia i sar., 2001; Haas, 2003).

Geometrijska morfometrija je zastupljena i u istraživanjima koja se bave morfološkom varijabilnošću punoglavaca tokom ontogenije, a njenom primenom moguće je kvantifikovati razlike u obliku i grafički predstaviti promene oblika, opisati kompleksne oblike i razumeti kako se oblik menja tokom razvića organizama (Ivanović i sar., 2009, 2011; Lawing i Polly, 2010; Kaliontzopoulou, 2011; Cvijanović i sar., 2014). Kod punoglavaca na različitim stupnjevima razvića metodama geometrijske morfometrije moguće je detektovati ontogenetske promene na nivou hondrokranijuma. Ova kompleksna struktura pokazuje morfološku varijabilnost, čak i kod srodnih vrsta (detaljnije u Larson i de Sá, 1998), a obzirom da je hondrokranijum usko povezan sa škragama i načinom ishrane, na osnovu njegove analize može se dobiti uvid i u ekomorfološke aspekte punoglavaca (Larson, 2005).

Metode geometrijske morfometrije su korišćene za uočavanje razlika u obliku usnog aparata kod različitih populacija iste vrste koje se hrane različitim vrstama hrane (Sousa i sar., 2014), a utvrđena je i korelisanost anatomije hiobranhijalnog skeleta i ekologije punoglavaca (Vera Candioti, 2006). Geometrijska morfometrija se koristila i u ispitivanjima uticaja herbicida i antibiotika na razvoj, veličinu, oblik i rast punoglavaca različitih vrsta (Katzenberger i sar., 2014; Peltzer i sar., 2017). Zbog velikog uticaja koje okruženje ima na oblik punoglavaca, izučavanje evolucije oblika njihovog tela u različitim staništima metodama geometrijske morfometrije bilo je predmet velikog broja istraživanja (Van Buskirk, 2009, 2017; Haad i sar., 2011; Baldo i sar., 2014; Marques i Nomura, 2015; Pezzuti i sar., 2016; Sherratt i sar., 2018). Punoglavci većine vrsta žaba naseljavaju heterogena staništa zbog čega imaju i veoma različite fenotipove (Orton 1953, 1957; Altig i Johnston, 1989; Relyea, 2000; Miner i sar., 2005). Odnosi fenotipa (morfologije) i ekologije (varijabilnosti resursa) punoglavaca (na nivou jedinki, populacija i zajednica), mogu se objasniti ekomorfološkim pristupom

(Peres-Neto i sar., 2006; Van Buskirk, 2009; Griffen i Mosblack, 2011). Ovim pristupom se mogu uočiti i morfološke razlike između vrsta koje nastaju usled delovanja ekoloških faktora (Irschick i Losos, 1999) i utvrditi na koji način pritisci iz okruženja određuju sastav vrsta u zajednici (Marques i Nomura, 2015; Sherratt i sar., 2018). Posebno uticajan sredinski faktor u pogledu morfologije punoglavaca predstavljaju predatori i metode geometrijske morfometrije se koriste za detektovanje i analiziranje njihovog uticaja na oblik tela punoglavaca različitih vrsta. Johnson i sar. (2008) su pokazali da punoglavci vrste *Rana sphenocephala* u prisustvu predatora imaju širi repni mišić i duže repove radi skretanja pažnje predatora sa ranjivog tela, a slične razlike u veličini i obliku detektovane su i kod punoglavaca vrste *Lithobates clamitans* (Johnson i sar., 2015). Takođe, metodama geometrijske morfometrije uočene su promene izazvane uticajem predatora u rastu, razvoju, ponašanju i spoljašnjoj morfologiji punoglavaca *R. temporaria* (Van Buskirk, 2017).

### **Kombinovanje tradicionalne i geometrijske morfometrije u analizama morfološke varijabilnosti punoglavaca**

Jedan broj studija morfološke varijabilnosti punoglavaca zasnovan je na kombinaciji oba morfometrijska pristupa. Tako je Larson (2002) koristio metode tradicionalne i geometrijske morfometrije za analize hondrokranijskog razvića vrste *Rana sylvatica* (od 27. do 39. stupnja prema Gosneru, 1960). Rezultati obe metodologije su se u velikoj meri podudarali i pokazali da rast hondrokranijskog razvića kod punoglavaca ove vrste nije izometrijski i da su različiti obrasci promena oblika prisutni u određenim regionima hondrokranijskog razvića. U kasnijem istraživanju, Larson (2005) je koristio metode geometrijske morfometrije kako bi utvrdio prisustvo alometrije tokom ontogenije kod šest vrsta roda *Rana*. Na osnovu oblika hondrokranijskog razvića, analizirane vrste su se jasno morfološki razdvojile u tri grupe koje su odgovarale međusobnim filogenetskim odnosima. Uočena je uska veza između ontogenije, filogenije i morfologije i istaknuta uloga razvića u interspecijskoj morfološkoj varijabilnosti, kao i neophodnost uključivanja i ontogenije i filogenije u studije evolucije hondrokranijskog razvića punoglavaca.

Jasna diskriminacija vrsta na osnovu oblika hondrokranijskog razvića ukazala je na potencijal metoda geometrijske morfometrije kao taksonomskog alata koji može biti korišćen za identifikaciju vrsta (Larson, 2005). Isti autor (Larson, 2004) je analizirao hondrokranijski razvoj punoglavaca vrste *Bufo americanus* (od 27. do 40. stupnja prema Gosneru, 1960) i dobio slične rezultate kao za punoglavce *R. sylvatica* (Larson, 2002). U ovom istraživanju on je dodatno testirao i postojanje intraspecijske varijabilnosti tri populacije punoglavaca *B. americanus* i utvrdio da se populacije jasno razdvajaju na osnovu oblika hondrokranijskog razvića. Iako je tokom ontogenije bio prisutan alometrijski rast, uočene su značajne razlike u obliku hondrokranijskog razvića još na ranim stupnjevima (27. i 28. Gosnerov stupanj) što je sugerisalo da alometrijski rast nije uzrok intraspecijskih razlika u obliku hondrokranijskog razvića kod ove vrste (Larson, 2004). Garriga i Llorente (2012) su takođe koristili metode tradicionalne i geometrijske morfometrije u svojoj studiji razvića hondrokranijskog razvića vrste *Pelodytes punctatus*, od stadijuma punoglavca do juvenilne jedinke, a u cilju kvantifikovanja razlika u obliku i alometriji tokom ontogenije. Utvrđeno je da promene oblika hondrokranijskog razvića kod analizirane vrste delom potiču od alometrije, tj. da veličina ima mali uticaj na ontogenetske promene oblika. Takođe, uočeno je da spoljašnji biotički faktori (dva tipa kompeticije) utiču na oblik hondrokranijskog razvića tokom ontogenije. Autori zaključuju da je ontogenija hondrokranijskog razvića analizirane vrste u velikoj meri konzervativna što otežava detektovanje uticaja filogenetskih i ekoloških faktora na varijabilnost oblika ove morfološke celine.

Pored hondrokranijskog razvića, primenom metoda i tradicionalne i geometrijske morfometrije, različiti autori su analizirali i intra- i interspecijsku varijabilnost tela punoglavaca. Analizirajući varijabilnost punoglavaca dve vrste roda *Pelobates*, Escoriza i Ben Hassine (2014) su uočili značajnu intraspecijsku varijabilnost, ali i značajne interspecijske morfološke razlike. Arendt (2010) je u svom istraživanju ispitivao brzinu plivanja, kao i odnose morfologije i brzine plivanja kod pet vrsta

punoglavaca (Scaphiropodidae). Utvrdio je da je morfologija punoglavaca velikim delom zaslužna za razlike u brzini plivanja svake vrste, što je opisano metodama i tradicionalne i geometrijske morfometrije. U navedenim studijama, autori (Arendt, 2010; Escoriza i Ben Hassine, 2014) se slažu da metode tradicionalne i geometrijske morfometrije daju slične rezultate, ali da se primenom geometrijske morfometrije mogu detektovati suptilne razlike kod analiziranih vrsta koje nisu bile očigledne u rezultatima dobijenim primenom metoda tradicionalne morfometrije.

Metodama tradicionalne i geometrijske morfometrije, Johansson i sar. (2010) su ispitivali da li fenotipske promene nastale rano u ontogeniji mogu da utiču na fenotip kasnijeg ontogenetskog stupnja, tj. da li brzina plivanja punoglavca može da utiče na dužinu skoka juvenilne jedinke. Utvrdili su da oblik tela punoglavca ima uticaj na brzinu plivanja, kao i da oblik tela juvenilne jedinke ima uticaj na dužinu skoka, ali da ne postoji korelacija između ove dve osobine kod dva ontogenetska stupnja, tj. da plivanje i skakanje nisu korelisani. Sa druge strane, uočili su da veličina punoglavca ima uticaj na veličinu juvenilne jedinke, te smatraju da se osobine povezane sa veličinom ne „razdvajaju” procesom metamorfoze.

### **1.5. Taksonomska identifikacija analizom spoljašnjih morfoloških karakteristika punoglavaca**

Mnoge vrste evropskih Anura su aktivne noću ili u večernjim časovima pa se adulti retko mogu videti u toku dana, osim u sezoni parenja (Arnold i Ovenden, 2002). Sa druge strane, uzorkovanje punoglavaca je efikasan i dobar način za procenu raznovrsnosti lokalne faune vodozemaca. Larve bezrepih vodozemaca provode duži vremenski period (od nekoliko nedelja do nekoliko meseci) u vlažnim staništima koja predstavljaju reproduktivne centre, tj. mesta za parenje i polaganje jaja, te su lakše uočljivi u odnosu na adultne jedinke iste vrste (Duellman i Trueb, 1994).

Taksonomska identifikacija punoglavaca se može izvršiti i u prirodnim staništima, obzirom da se neke vrste lako razlikuju po siluetama tela, boji i veličini na kasnijim stupnjevima razvića. Međutim, punoglavci određenih vrsta poput mrkih žaba su veoma slični, ali i morfološki varijabilni, što ih čini teškim za identifikaciju (McDiarmid i Altig, 1999; Arnold i Ovenden, 2002; Ambrogio i Mezzadri, 2014). Zbog toga je kod taksonomskih poređenja punoglavaca nekih vrsta žaba bitno uzeti u obzir i intraspecijsku varijabilnost fenotipskih osobina (Relyea, 2002). Ova varijabilnost nastaje u datoj populaciji jer je fenotip punoglavaca rezultat kombinacije genetički fiksiranih osobina (deterministički fenotip) i uticaja sredinskih faktora (Van Buskirk, 2000). Iz ovog razloga punoglavci nekih vrsta svojim morfološkim osobinama odražavaju specifičnosti geografskih uslova u kojima borave (Merilä i sar., 2000; 2004; Escoriza i Ben Hassine, 2014).

Taksonomsku identifikaciju punoglavaca na osnovu njihove morfologije dodatno otežava činjenica što od izleganja do metamorfoze punoglavci prolaze kroz niz morfoloških promena. Iz ovog razloga je neophodno ispitati i varijabilnost morfoloških karaktera tokom njihovog razvića (Grosjean, 2005; Saha i Gupta, 2011). Za analize morfološke varijabilnosti tokom razvića punoglavaca najčešće se koristi tzv. Gosnerova tablica (Gosner, 1960) u kojoj je predstavljeno 46 stupnjeva razvića počev od deljenja jajeta do transformacije punoglavca u metamorfoziranu juvenilnu žabu (Tabela 1).

U ekološkim i studijama razvića uglavnom se koriste sledeći termini za razvojne stupnjeve larvi žaba (McDiarmid i Altig, 1999):

**Tabela 1.** Pojednostavljena tablica razvojnih stupnjeva prema Gosneru (1960).

Naziv razvojnog stupnja	Engleski naziv razvojnog stupnja	Stupnjevi	
Embrioni	<i>Embryos</i>	1. do 19.	
Punoglavci	Rani punoglavci	<i>Hatchlings</i>	20. do 25.
	Larve	<i>Larvae</i>	26. do 41.
Metamorfi	<i>Metamorphs</i>	42. do 46.	

Kod nekih vrsta su punoglavci na ranim stupnjevima (stupnjevi 23. do 25. prema Gosneru, 1960) vizuelno veoma slični (McDiarmid i Altig, 1999), što na terenu dodatno otežava njihovu identifikaciju (Arnold i Ovenden, 2002) i zbog čega su ovi rani uzrasni stupnjevi posebno interesantni. Prema McDiarmid i Altig (1999), punoglavci tokom razvića prolaze kroz dve faze sa značajnim promenama: pre 25. i posle 42. stupnja. Stupnjevi koji se smatraju najpogodnijim za određivanje pripadnosti nekoj vrsti su od 31. do 39. stupnja, jer ih odlikuje dovoljno prisutnih i prepoznatljivih karaktera. Mnogi autori su u svojim istraživanjima opisivali različite stadijume (Sidorovska i sar., 2002; Grosjean, 2005; Lima i Pederassi, 2012; Sherratt i sar., 2017), ali se većina fokusirala na stupnjeve od 37. do 39. (Johansson i sar., 2010; Lima i Pederassi, 2012; Sousa i sar., 2014; Sherratt i sar., 2018). Grosjean (2005) je analizirao morfološke karaktere i razvojne stupnjeve punoglavaca koji bi bili odgovarajući za taksonomsku identifikaciju Anura. Prema istom autoru, punoglavci vrste *Rana (Sylvirana) nigrovittata* između 32. i 40. stupnja poseduju kompletan set karaktera za pravilnu identifikaciju i samo bi ovakve punoglavce trebalo koristiti u taksonomiji i sistematici, dok se raniji razvojni stupnjevi mogu koristiti ukoliko za datu vrstu punoglavaca na tom stupnju postoje detaljni opisi. Grosjean (2005) je dalje ukazao na činjenicu da više autora koristi „klimaksni” razvojni period kao osnovu za svoj opis „zrelog” punoglavca (Boulenger, 1897 – 1898; Wright, 1924; Nichols, 1937; Orton, 1946, 1947; Gosner i Black, 1954, 1957; Inger, 1956; Gosner, 1959; Hampton i Volpe, 1963; Wassersug i Duellman, 1984; Wassersug, 1989). Međutim, većina istraživača nije jasno definisala larvene stupnjeve koji odgovaraju „klimaksu”. Izuzetak je Wassersug (1973) koji je „smestio” ovaj koncept između 26. i 36. stupnja. U svakom slučaju, termin „zreli” bi trebalo izbegavati za punoglavce i ograničiti njegovu upotrebu na adultne jedinke (Grosjean, 2005).

Imajući u vidu rastući interes za istraživanja punoglavaca veoma je bitna njihova pouzdana identifikacija (McDiarmid i Altig, 1999). Ovo je posebno važno u uskim zonama simpatrije i pojave sintopije različitih vrsta žaba kao što je slučaj u jugoistočnoj Evropi (Sidorovska i sar., 2002; Dufresnes i sar., 2013; Vukov i sar., 2013), uključujući i Srbiju. Sintopne vrste su često morfološki veoma slične, pa ih je teško identifikovati izuzev prema načinu oglašavanja (što je moguće samo tokom reproduktivne sezone) ili molekularno-genetičkim metodama (Larson i Chippindale, 1993). Iako su molekularno-genetičke metode sada relativno lako dostupne, morfološke karakteristike su i dalje dragocene za brzu identifikaciju vrsta na određenom lokalitetu (Borzée i sar., 2013).

Teritoriju Srbije naseljava 13 vrsta žaba iz pet porodica: Hylidae (*Hyla arborea*), Bombinatoridae (*Bombina bombina*, *B. variegata*), Bufonidae (*Bufo bufo*, *Bufo viridis*), Pelobatidae (*Pelobates fuscus*, *P. syriacus*) i Ranidae (*Pelophylax lessonae*, *P. kl. esculentus*, *P. ridibundus*, *Rana dalmatina*, *R. graeca* i *R. temporaria*) (Vukov i sar., 2013). Između nekih od ovih vrsta postoji preklapanje reproduktivnog perioda i sintopija larvenih faza što se može predstaviti putem grube fenološke podele na vrste čija reproduktivna sezona počinje u rano proleće (od kraja februara do kraja marta u nizijskim delovima Srbije), sredinom proleća (od kraja marta do prve polovine maja u nizijskim predelima Srbije) i krajem proleća (od druge polovine maja u nizijskim delovima Srbije). U prvu fenološku grupu spadaju vrste roda *Pelobates*, zatim vrste roda *Rana* i obična krastača (*Bufo bufo*). Drugoj fenološkoj grupi pripadaju vrste roda *Bombina*, *Hyla arborea* i vrste roda *Pelophylax*, dok trećoj fenološkoj grupi pripada vrsta *Bufo viridis* (Radovanović, 1951; Arnold, 2004).

Identifikacija na osnovu izgleda grupacija jaja i pripadnosti jednoj od tri pomenute fenološke grupe je moguća do nivoa roda. Međutim, rani larveni stadijumi nekih vrsta žaba iz iste fenološke grupe nisu pogodni za vizuelnu identifikaciju zbog slične veličine, oblika i boje. Stoga je analiza njihove morfologije jedan od mogućih načina taksonomske identifikacije (Duelmann i Trueb, 1994; Grosjean, 2005; Vejarano i sar., 2006), naročito u slučajevima kada je genetička identifikacija nedostupna, a potrebno je prepoznati prisustvo vrsta na većem broju lokaliteta i u relativno kratkom vremenskom roku. Primera radi, vrste mrkih žaba *Rana dalmatina* i *R. temporaria* uglavnom polažu jaja u stajaćim vodama, a *R. graeca* u tekućicama (potoci i manje reke) (Gasc i sar., 1997; Arnold, 2004; Ambrogio i Mezzadri, 2014), ali ne uvek, pa taksonomsko razlikovanje jaja sintopnih populacija ovih vrsta vizuelnom metodom može biti teško uprkos detaljnim literaturnim opisima (Arnold, 2004).

Poznavanje morfoloških karakteristika punoglavaca je važno i u konzervacionoj biologiji (Lima i Pederassi, 2012). Faktori ugrožavanja vodozemaca u Srbiji su brojni: fragmentacija, narušavanje i gubitak staništa, alohtone (i invazivne) vrste, intenzivni i nekontrolisani pritisci infrastrukture i stradanje vodozemaca na putevima, zagađenje životne sredine, eksploatacija zemljišta, globalne klimatske promene, legalna i ilegalna trgovina vrstama, povećano UV-B zračenje, širenje određenih bolesti, sve učestalija pojava deformiteta u populacijama, ali i sinergističko dejstvo svih ovih faktora (Crnobrnja-Isailović i Paunović, 2015; Kalezić i sar., 2015). Ekosistemi u Srbiji i okruženju se nalaze pod velikim antropogenim pritiscima, kao što su hidrogeomorfološke modifikacije (npr. pravljenje brana, regulacija rečnog toka, separacija peska i šljunka), zagađenje organskim materijama i polutantima kao i hazardnim supstancama (Tripković i sar., 2003, 2004; Lazarević i sar., 2011; Simonović i sar., 2011). Takođe, introdukovane vrste mogu imati veliki uticaj na akvatične zajednice (Paunović i sar., 2004; Panov i sar., 2009; Zorić i sar., 2011). Od posebnog značaja je i činjenica da je grupa zelenih žaba dodatno ugrožena usled dugotrajnog komercijalnog sakupljanja koje se i dalje praktikuje uprkos zakonskim merama (Crnobrnja-Isailović i Paunović, 2015). Zbog svega navedenog, brza i precizna identifikacija vrsta žaba za potrebe ekoloških studija i studija procene uticaja na životnu sredinu postaje sve neophodnija.

## **2. CILJEVI STUDIJE**

Osnovni ciljevi studije:

- Utvrđivanje onih osobina spoljašnje morfologije larvenih stadijuma sintopnih vrsta mrkih žaba (*Rana dalmatina*, *R. graeca*, *R. temporaria*) i obične krastače (*Bufo bufo*) na teritoriji Srbije koje opisuju veličinu i oblik tela, a na osnovu kojih se može odrediti njihova taksonomska pripadnost
- Utvrđivanje efikasnosti primene analize oblika tela punoglavaca u taksonomskoj identifikaciji analiziranih vrsta žaba
- Razvoj procedura za pouzdanu, brzu i ekonomičnu taksonomsku identifikaciju larvi analiziranih vrsta žaba

U skladu sa osnovnim, definisani su i sledeći specifični ciljevi ove studije:

- Taksonomska genetička identifikacija *Rana dalmatina*, *R. graeca*, *R. temporaria* i *Bufo bufo* iz populacija sa teritorije Srbije
- Poređenje metoda tradicionalne i geometrijske morfometrije u morfološkoj diferencijaciji ranih larvenih stadijuma kod sintopnih populacija *R. dalmatina*, *R. graeca*, *R. temporaria* i *B. bufo*
- Poređenje filogenetskih i fenetičkih odnosa analiziranih vrsta



### **3. MATERIЈAL I METODE**

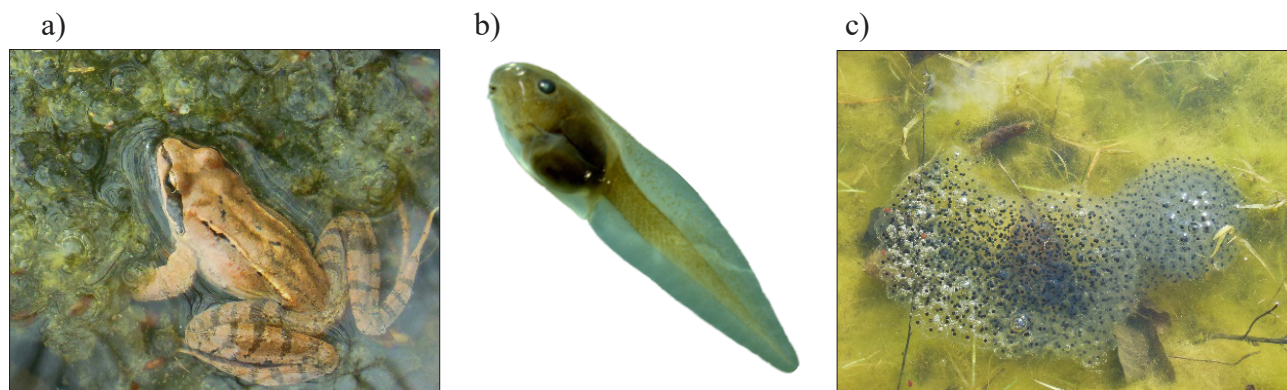
### 3.1. Objekat istraživanja

#### 3.1.1. Vrste roda *Rana* u Srbiji

Tri vrste mrkih žaba koje naseljavaju Srbiju su: *R. dalmatina* Bonaparte, 1840 – šumska žaba, *R. graeca* Boulenger, 1891 – grčka žaba i *R. temporaria* Linnaeus, 1758 – livadska žaba, odnosno žaba travnjača (Vukov i sar., 2013; Sillero i sar., 2014; Kalezić i sar., 2015). Sve tri vrste postaju aktivne u rano proleće i njihova sezona parenja se brzo završava (Hartel, 2005; Iosob i Prisecaru, 2014; Crnobrnja-Isailović i sar., 2015).

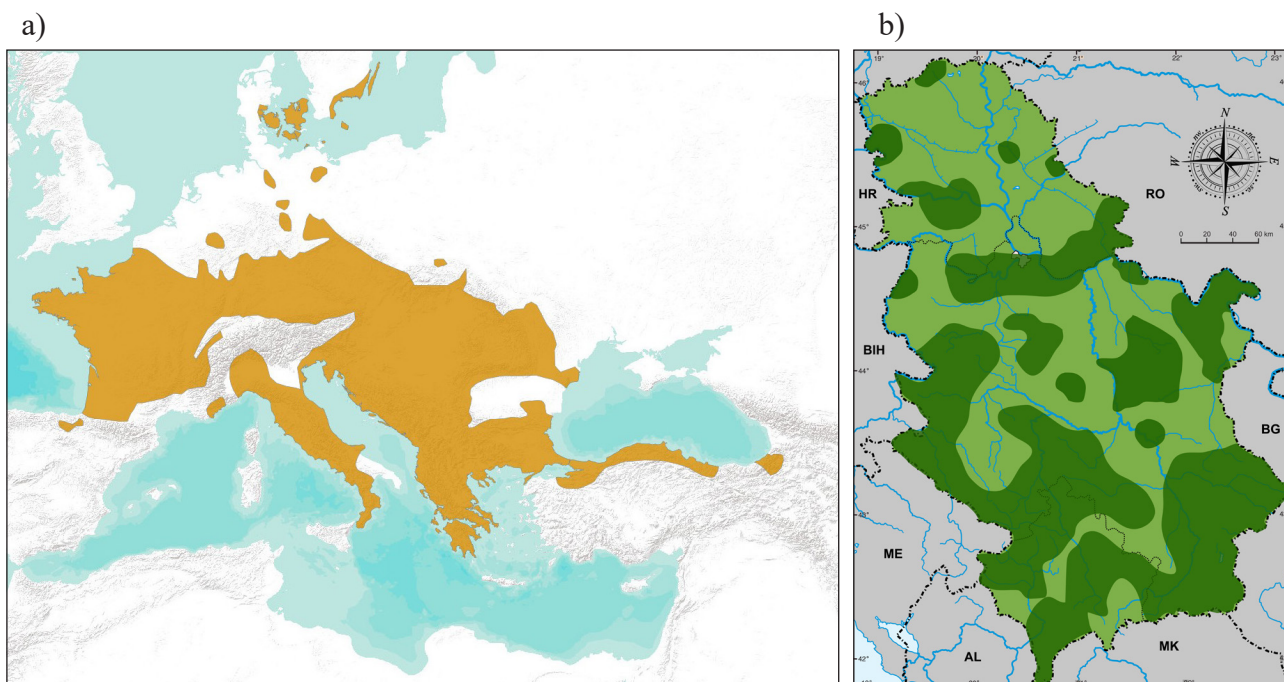
#### *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840

Šumska žaba, *Rana dalmatina* (Slika 1) je široko rasprostranjena vrsta u Evropi (Slika 2a), gde naseljava različite predele, uglavnom termofilne listopadne šume, a gustina populacija u okviru areala veoma varira.



**Slika 1.** *Rana dalmatina*. a) adult; b) punoglavac; c) jaja (foto: M. Ilić).

Na severu areala (Nemačka, Poljska, Češka, Slovačka, Danska i južna Švedska) ova vrsta ima fragmentisan areal. Najsevernija populacija je zabeležena u Švedskoj, a najzapadnija u Francuskoj. U Italiji je *R. dalmatina* vrsta prisutna u visokoj gustini, kao i u delovima Austrije, Mađarske i Ukrajine (Karpati), po celom Balkanu do Crnog mora i Peloponeza, a postoji i izolovana oblast koju naseljava u maloj Aziji. U srednjoj Evropi se ne nalazi na brdima i planinama (npr. Alpi), jer joj klima ne odgovara. U Italiji i na Balkanskom poluostrvu se može naći na visini i do 1500 m, a u južnoj Švajcarskoj je zabeležena na 1100 m. Međutim, u predelima severno od Alpa naseljava niže predele (200 do 600 m), retko do 800 m (Grossenbacher, 1997a; Kuzmin i sar., 2004; Ambrogio i Mezzadri, 2014).



**Slika 2.** Rasprostranjenje *Rana dalmatina*. a) globalno (IUCN, 2009a); b) u Srbiji (Vukov i sar., 2013).

U južnoj Evropi (Italija i Balkansko poluostvo) njene populacije su brojne i vrsta nije ugrožena. Međutim, u srednjoj i severnoj Evropi šumska žaba se smatra ugroženom zbog retkih nalaza i fragmentisanog areala (Radovanović, 1951; Grossenbacher, 1997a; Arnold i Ovenden, 2002). U Srbiji je ovo jedna od najrasprostranjenijih vrsta i naseljava čitavu teritoriju zemlje (Slika 2b), te nema status ugrožene vrste (Kalezić i sar., 2015). Populacije šumske žabe se smatraju genetički prilično homogenim, kako u čitavoj Evropi, tako i u Srbiji (Vences i sar., 2013; Vukov i sar., 2013).

*R. dalmatina* polaže jaja u sporotekućim do stajaćim vodama, privremenim barama/lokvama sa različitim podlogom, u bazenčićima rečnih korita, barama sa i bez podvodne i emerzne vegetacije, u napuštenim bazenima, izvorima, meandrima i kolotrazima napunjenim kišnicom. Položeno klupko se sastoji od više hiljada jaja (do 4000) i nepravilnog je oblika, najčešće pričvršćeno za podvodne grančice, korenje ili akvatičnu vegetaciju, a posle nekog vremena isplivava na površinu.

Iako je poželjno da nema ribe u vodi gde ova vrsta polaže jaja, zabeležena je i u prisustvu zlatne ribice, štuke i maloustog basa. Zavisno od dela areala i nadmorske visine, ova vrsta polaže jaja od januara do aprila, a najčešće u februaru i martu. Optimalna temperatura vode pri polaganju jaja je tek nešto malo iznad 0°C, ali je uglavnom između 7°C i 12°C. Inkubacija jaja zavisi od temperature i varira od 15 do 30 dana. Faza larve traje dva do tri i po meseca, zavisno od temperature, dostupnosti hrane i gustine punoglavaca (Grossenbacher, 1997a; Arnold i Ovenden, 2002; Ambrogio i Mezzadri, 2014).

Po veličini, punoglavac šumske žabe spada u srednje velike, a njegove spoljašnje karakteristike veoma variraju zavisno od geografske dužine i širine, kao i od tipa staništa. Tek izlegli punoglavac ima dobro razvijen rep u poređenju sa larvama vrste *R. temporaria*. Telo je ovalno i izduženo, anteriorno blago udubljeno. Rep punoglavca je tanak, dugačak, sa špicastim ili zaobljenim vrhom, oko 1,5 puta duži od tela. Repna peraja su dobro razvijena; dorzalno je više od ventralnog i doseže do trećine tela. Analni otvor se nalazi sa desne strane, dok je spirakulum pozicioniran na levoj. Boja tela na dorzalnom delu varira od svetlije do tamnije, dok je ventralna uglavnom svetla. Na boku su svetlije tačkice nepravilnog rasporeda (Arnold i Ovenden, 2002; Ambrogio i Mezzadri, 2014).

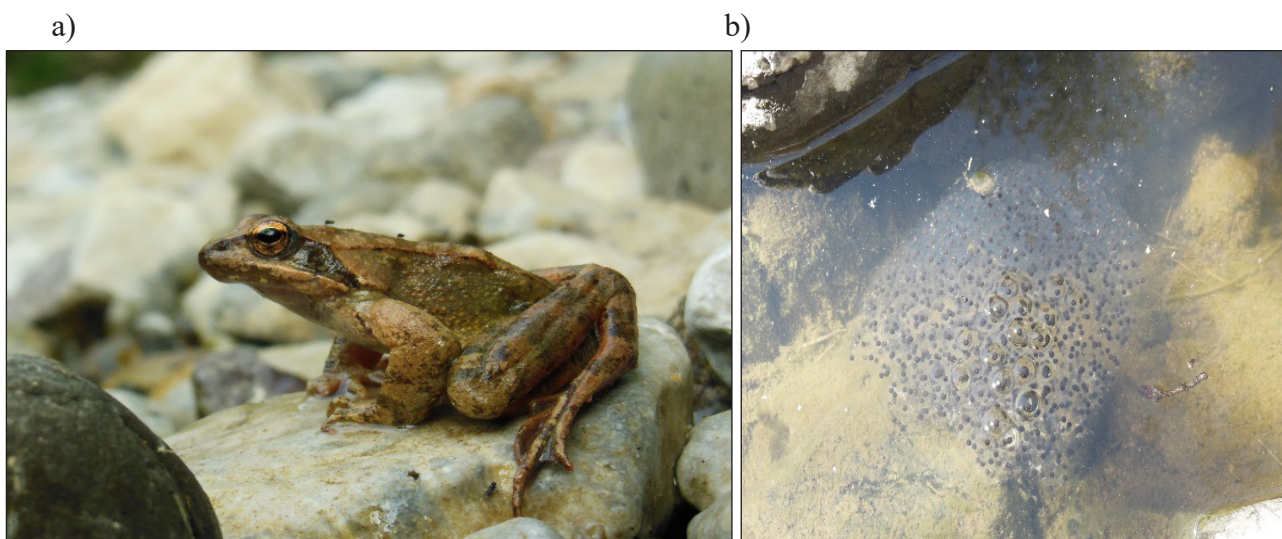
Punoglavci šumske žabe se najčešće nalaze u bentosu, mada istražuju i ostale delove vodenih staništa, kao na primer površinu vode gde se hrane bakterijskim filmom. Tipično se mogu naći u

svetlim, plitkim vodama, gde se grupišu, najverovatnije zbog termoregulacije. Odlični su plivači zahvaljujući dugom i jakom repu pomoću koga brzo beže od predatora kao što su larve Odonata, sakrivajući se u supstratu na dnu. Punoglavci šumske žabe su uglavnom detritivorni i fitofagni, ali u nekim prilikama mogu konzumirati i hranu životinjskog porekla, poput mrtvih žaba ili crva, kao i jaja i tek izlegle larve drugih vrsta (Ambrogio i Mezzadri, 2014).

Javljaju se u sintopiji sa larvama drugih repatih i bezrepih vodozemaca, uključujući i *B. bufo*, *R. temporaria* (Ambrogio i Mezzadri, 2014), kao i sa *R. graeca* (neobjavljeni podaci Jelka Crnobrnja-Isailović i Marija Ilić).

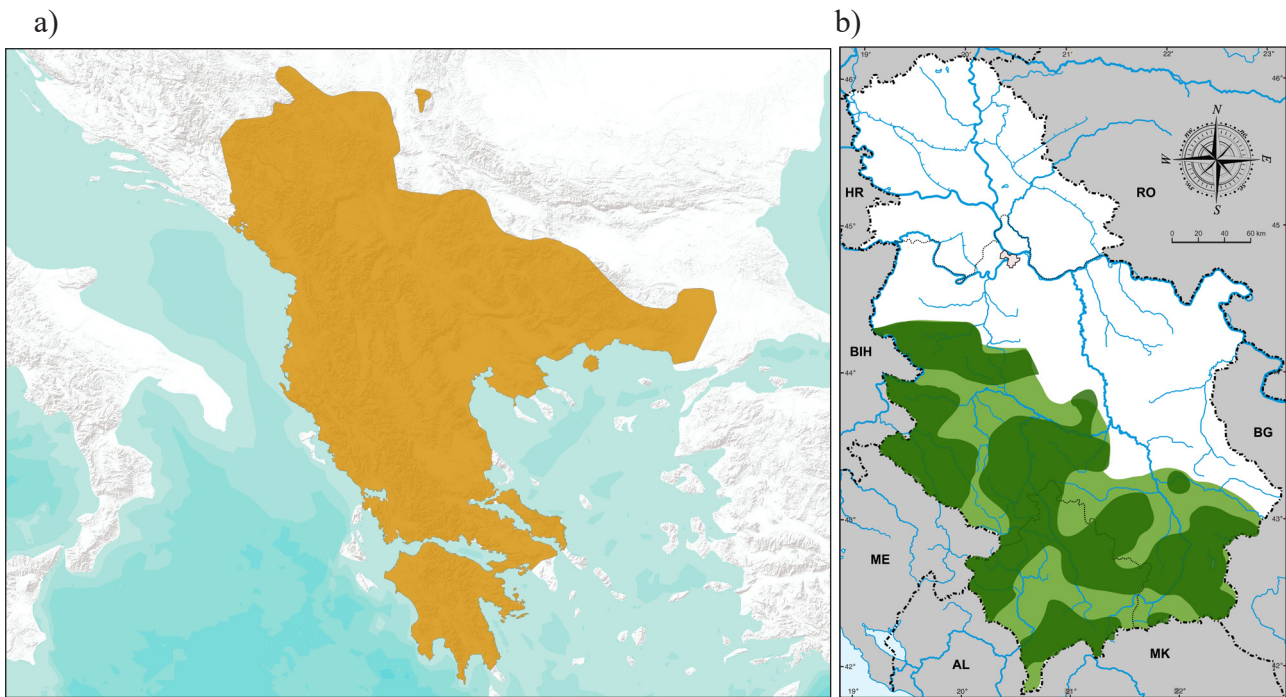
### **Rana graeca Boulenger, 1891**

*Rana graeca* (Slika 3) je endemska vrsta Balkanskog poluostrva i njen areal se prostire od centralne Bosne i Hercegovine na zapadu, preko Srbije, Crne Gore, Republike Severne Makedonije, gotovo cele Albanije, najvećeg dela Grčke i južne i zapadne Bugarske do turske Trakije (Slika 4a).



**Slika 3.** *Rana graeca*. a) adult; b) jaja (foto: M. Ilić).

U Grčkoj se nalazi na 240 do 1400 m, a u Bugarskoj na nešto nižim nadmorskim visinama (280 do 1150 m). Javlja se u brdsko-planinskoj zoni listopadnih ili mešovutih šuma, od 200 do 2100 m nadmorske visine, u brzim potocima kamenitog dna sa malo vegetacije (Radovanović, 1951; Arnold i Ovenden, 2002; Kalezić i sar., 2015). Nekad se može naći na nižim nadmorskim visinama (Džukić, 1968; Kalezić i sar., 2015). Na areal ove vrste veoma utiču klimatski uslovi; preferira hladnija i vlažnija područja u brdovitim i planinskim dolinama, ali bez dugih i hladnih zima (Radovanović, 1951; Asimakopoulos, 1997).



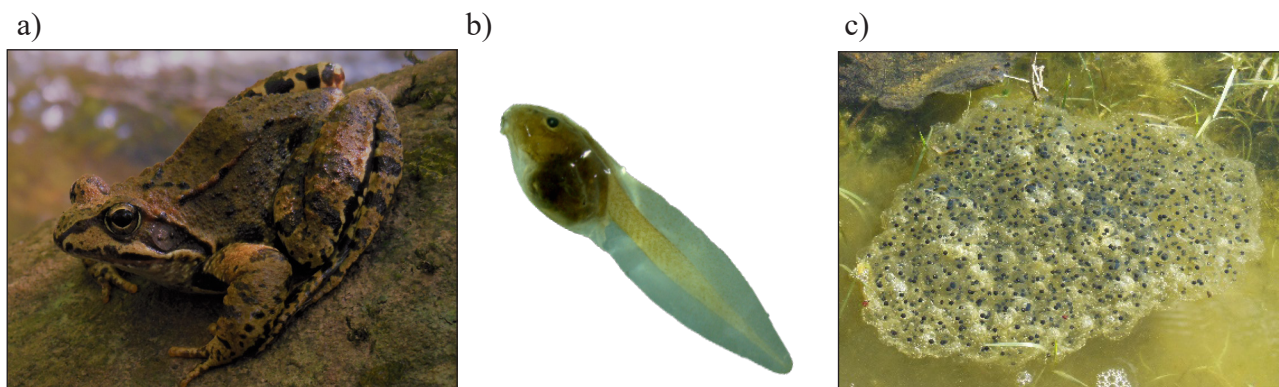
**Slika 4.** Rasprostranjenje *Rana graeca*. a) globalno (IUCN, 2009b); b) u Srbiji (Vukov i sar., 2013).

*R. graeca* ima stabilnu gustinu populacija na srednjim i visokim nadmorskim visinama. Na globalnom nivou se ne smatra ugroženom, ali je osetljiva na narušavanje staništa, posebno u Grčkoj gde su česti požari (Asimakopoulous, 1997; Lymberakis i sar., 2009; Kalezić i sar., 2015). U Srbiji se grčka žaba nalazi na severnoj granici areala, naseljava manje od 50% teritorije (Slika 4b) i pokazuje stabilan populacioni trend. Rasprostranjenje je kompaktno u brdsko-planinskim predelima, te nema značajne fragmentacije staništa (Vukov i sar., 2013; Kalezić i sar., 2015). Prema IUCN kategoriji (IUCN, 2001), smatra se da je najmanje zabrinjavajuća vrsta (LC). Prema nacionalnoj kategoriji ugroženosti na osnovu DEŽI kriterijuma (analiza na osnovu odlika koje obuhvataju distribuciju, ekologiju i životnu istoriju vrste, engl. *Analyses of distribution, ecology and life-history traits*, DELH) ima status ugrožene vrste (EN), što je posledica njenog endemičnog areala i postojanja perifernih populacija (Vukov i sar., 2013, 2015; Kalezić i sar., 2015).

Reproduktivni period traje od februara do aprila, zavisno od geografske širine i nadmorske visine, a jaja polaže u vidu manjih, grozdastih agregata (najčešće 600 do 800 jaja), često ispod kamenja ili u šupljinama u mirnim delovima brzih, planinskih potoka. Inkubacija jaja obično traje od jedne do dve nedelje (Arnold i Ovenden, 2002).

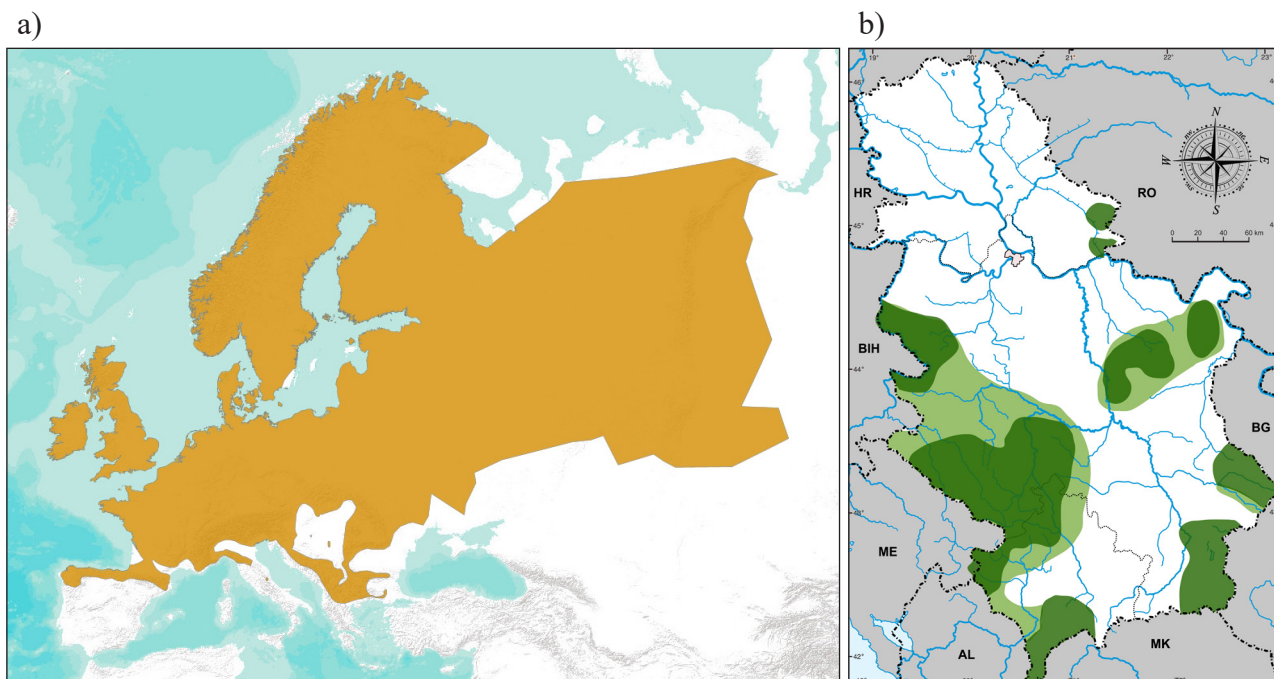
## **Rana temporaria Linnaeus, 1758**

Žaba travnjača, *Rana temporaria* (Slika 5) je veoma varijabilna u formi i boji, a smatra se jednom od najrasprostranjenijih vrsta vodozemaca u Evropi, gde naseljava predele od Španije na zapadu, do Urala i zapadnog Sibira na istoku (Slika 6a).



**Slika 5.** *Rana temporaria*. a) adult; b) punoglavac; c) jaja (foto: M. Ilić).

Južne granice areala se pružaju kroz severnu Albaniju, zatim dalje ka istoku kroz južnu Bugarsku, severnu Grčku, preko Moldavije i Ukrajine do severnog Kazahstana. Na severu areala je zabeležena na nivou mora, dok se na Pirinejima i severnim Alpima nalazi na preko 2800 m nadmorske visine. Na Balkanskom poluostrvu je široko rasprostranjena, ali je areal disjunktan i naseljava zonu visokih planina (Radovanović, 1951; Grossenbacher, 1997b; Arnold i Ovenden, 2002; Vukov i sar., 2013; Kalezić i sar., 2015).



**Slika 6.** Rasprostranjenje *Rana temporaria*. a) globalno (IUCN, 2009c); b) u Srbiji (Vukov i sar., 2013).

U mnogim zemljama srednje i severne Evrope *R. temporaria* se ne smatra ugroženom i ima stabilan populacioni trend. Mogući faktori ugrožavanja su porobljavanje i narušavanje staništa (Grossenbacher, 1997b; Kuzmin i sar., 2009). U Srbiji ova vrsta ima široko rasprostranjenje (Vukov i sar., 2013), ali joj je areal fragmentisan i naseljava manje od 50% teritorije (Slika 6b), te se smatra retkom. Prema IUCN kategorizaciji (IUCN, 2001), ima status gotovo ugrožene vrste vodozemaca (NT), a prema DEŽI kriterijumima, smatra se najmanje zabrinjavajućom (LC) (Vukov i sar., 2015; Kalezić i sar., 2015).

U skorije vreme uočeno je da je vrsta pod negativnim antropogenim pritiscima, a posebno su ugrožene južne populacije usled globalnog zagrevanja. Zbog narušavanja staništa i ograničavanja vrste na hladna i vlažna staništa visokih planina, neophodno je revidiranje statusa ugroženosti vrste i moguće konzervacije (Crnobrnja-Isailović i Paunović, 2015).

Ženke najčešće polažu jaja zajedno, u plitkim barama, u bazenčićima na planinskim livadama, močvarama i lokvama, čak i u zamrznutim vodnim telima. Klupko može da sadrži do 4500 jaja i ubrzo po poleganju isplivava na površinu vode. Zavisno od geografske širine i nadmorske visine, jaja se polažu od decembra do jula. Inkubacija traje osam do 21 dan, što najviše zavisi od temperature vode, kao i od temperature samog klupka jaja koja može biti i za 10°C viša u odnosu na okolnu (Ambrogio i Mezzadri, 2014).

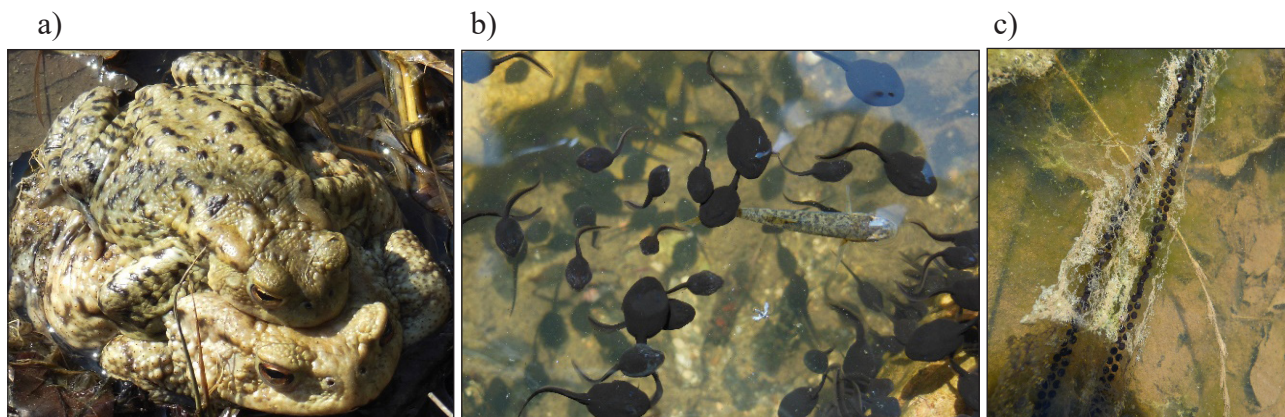
Larvena faza traje sedam do 16 nedelja, a može biti i veoma kratka (čak i 2,5 nedelje). Punoglavci su srednje veličine, a njihov oblik i veličina veoma zavise od geografske dužine i širine, kao i lokacije staništa. Tek izlegli punoglavac ima slabo razvijen rep i razgranate, spoljašnje škrge (suprotno u odnosu na punoglavca vrste *R. dalmatina*). Telo je ovalno, braon boje ili tamnije. Rep je tanak, dva puta duži od tela, sa zaobljenim vrhom. Dorzalno repno peraje je iste visine kao ventralno ili je čak i više od njega, pruža se do tela i ne doseže do zadnje trećine. Ponekad je prisutno udubljenje ili „sedlo” koje se nalazi u liniji sa okom i najvišom tačkom peraja. Analni otvor je pomeren blago u desno, dok je spirakulum orijentisan levo. Dorzalni delovi tela su braon ili tamniji, prošarani tačkicama, a na ventralnoj strani se mogu nalaziti providne tačkice (Arnold i Ovenden, 2002; Ambrogio i Mezzadri, 2014).

Punoglavci se obično grupišu u agregate kako bi se ugrejali u plitkim vodama ili zaštitili od predatora. Hrane se detritusom, algama, bakterijskim filmom sa površine vode, čak i leševima adulta i jajima svoje vrste. Punoglavci *R. temporaria* se mogu naći u sintopiji sa larvama drugih vrsta vodozemaca (uključujući *B. bufo* i *R. dalmatina*) (Ambrogio i Mezzadri, 2014).

*R. temporaria* je jedina vrsta koja je zabeležena i u regionima koji nisu bili pod ledom u vreme glacijacije. Smatra se da je bila široko rasprostranjena na Iberijskom poluostrvu odakle je rano migrirala. Bila je sposobna da opstane u različitim oblastima, gde se dalje diferencirala unutar refugijuma, odakle verovatno i potiče njena visoka morfološka, ekološka i genetička varijabilnost (Vences i sar., 2013).

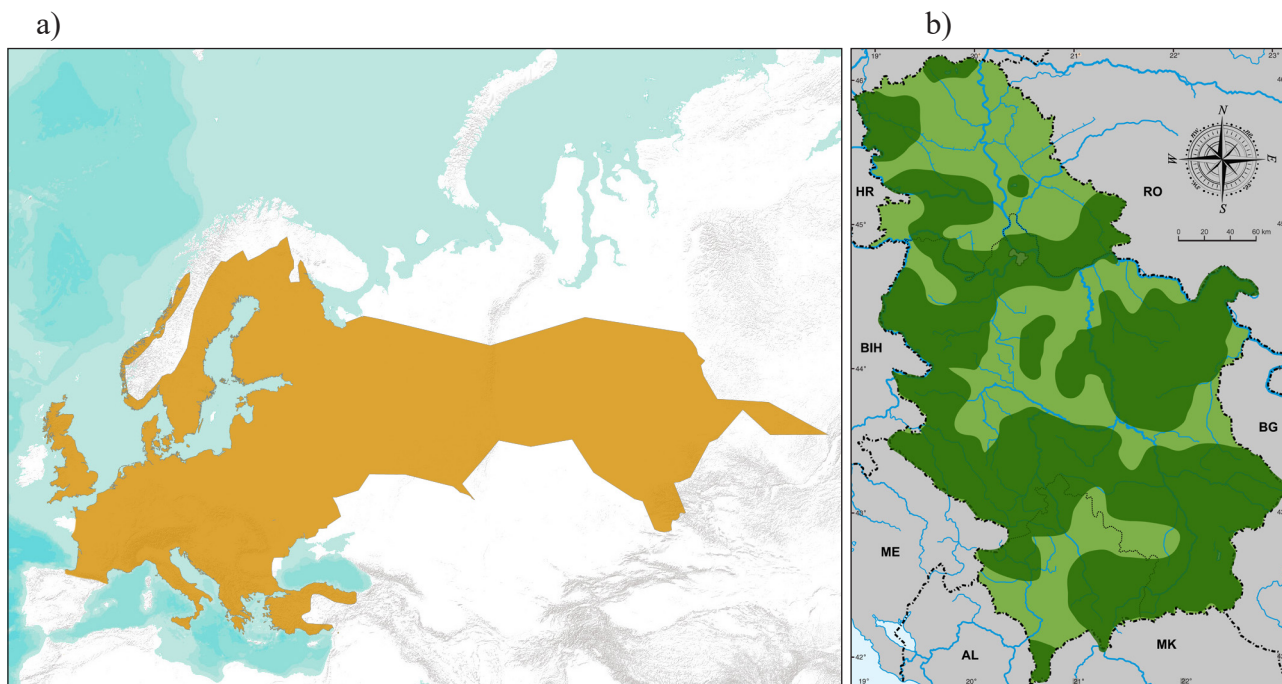
### 3.1.2. *Bufo bufo* Linnaeus, 1758

Četvrta vrsta koja takođe naseljava centralni Balkan, a aktivna je i polaže jaja u rano proleće kao mrke žabe, je obična krastača, *Bufo bufo* Linnaeus, 1758 (Slika 7).



Slika 7. *Bufo bufo*. a) adult; b) punoglavac; c) jaja (foto: M. Ilić).

Ova vrsta je prisutna u skoro celoj Evropi (Slika 8a). Relativno skoro je utvrđeno da populacije koje naseljavaju severozapadnu Afriku, Iberijsko poluostrvo, jugozapadnu Francusku i Džersi u okviru Kanalskih ostrva - teritorija Velike Britanije formiraju zasebnu vrstu *Bufo spinosus* (Recuero i sar., 2012). *B. bufo* naseljava područja od nivoa mora do preko 2500 m nadmorske visine (na jugu areala). Ovo je najveća vrsta krastače u Evropi, česta je u gotovo svim delovima svog areala i karakteriše se velikom ekološkom plastičnošću. Narušavanje staništa je glavni faktor ugrožavanja ove vrste (Borkin i Veith, 1997; Arnold i Ovenden, 2002; Agasyan i sar., 2009; Ambrogio i Mezzadri, 2014).



**Slika 8.** Rasprostranjenje *Bufo bufo*. a) globalno (IUCN, 2009d, modifikovano prema Recuero i sar., 2012); b) u Srbiji (Vukov i sar., 2013).

*B. bufo* naseljava čitavu teritoriju Srbije (Slika 8b) i ne smatra se ugroženom vrstom (Vukov i sar., 2013, 2015).

Reprodukcija se odigrava u različitim tipovima vodenih tela: u stajaćim i tekućim, u jezerima, u dubljim i plićim barama, lokvama, močvarama, kao i potocima sa sporim tokom, a zabeležena je i u blago brakičnim vodama. Ženke obično polažu 3000 do više od 8000 jaja u vidu želatinozne niti unutar koje su jaja poređana u dva reda.

Jaja se polažu od kasnog januara do juna (zavisno od geografske širine i nadmorske visine lokaliteta) i inkubacija traje 10 do 15 dana. Tek izlegli punoglavci nemaju mogućnost kretanja, zbog čega se pričvršćuju na želatinoznu traku, a hrane se ostacima jaja. Larvena faza traje od jednog do četiri i po meseca, što zavisi do temperature. Prezimljavanje punoglavaca je moguće i dešava se u slučaju da su jaja položena u jesen (Arnold i Ovenden, 2002; Ambrogio i Mezzadri, 2014).

Punoglavci obične krastače su srednje veličine, telo im je ovoidno, prilično izduženo i blago udubljeno. Oči su pozicionirane dorzalno unutar kontura tela; spirakulum se nalazi na levoj strani, a analni otvor centralno. Rep je tri do četiri puta duži nego širi, sa dorzalnim i ventralnim perajima gotovo jednako razvijenim. Vrh repa je zaobljen i ima izgled špatule. Dorzalno peraje se ne pruža preko tela. Dorzalna strana tela je veoma tamna, braonkasto-crne, tamnosive ili potpuno crne boje, nekad prošarana tačkicama koje liče na brašno. Spoljašnje karakteristike punoglavaca malo variraju na različitim geografskim područjima ili tipovima staništa (Arnold i Ovenden, 2002; Ambrogio i Mezzadri, 2014).



Za izlegle punoglavce obične krastače karakteristično je da se grupišu u velike agregate, dugačke i po nekoliko metara. Na ovaj način se jedinke štite od predatora, ali se i uspostavlja termoregulacija celog agregata u plitkim i hladnim planinskim staništima. Punoglavci nisu dobri plivači i kreću se sporo. Hrane se omnivorno, detritusom, struganjem perfitona sa biljaka, ili se hrane planktonom, a u retkim slučajevima se javlja kanibalizam što povoljno utiče na njihov razvoj. Punoglavci *B. bufo* sadrže toksični sekret (bufotoksini) u koži zbog čega ih predatori izbegavaju. Ukoliko je ranjen, punoglavac oslobađa tzv. „alarm” supstancu koja je signal ostalim jedinkama za hitan beg od predatora (Duellman i Trueb, 1994; Arnold i Ovenden, 2002; Ambrogio i Mezzadri, 2014).

Punoglavci *B. bufo* žive u sintopiji sa drugim vodozemcima, uključujući punoglavce mrkih žaba (Arnold i Ovenden, 2002; Ambrogio i Mezzadri, 2014).

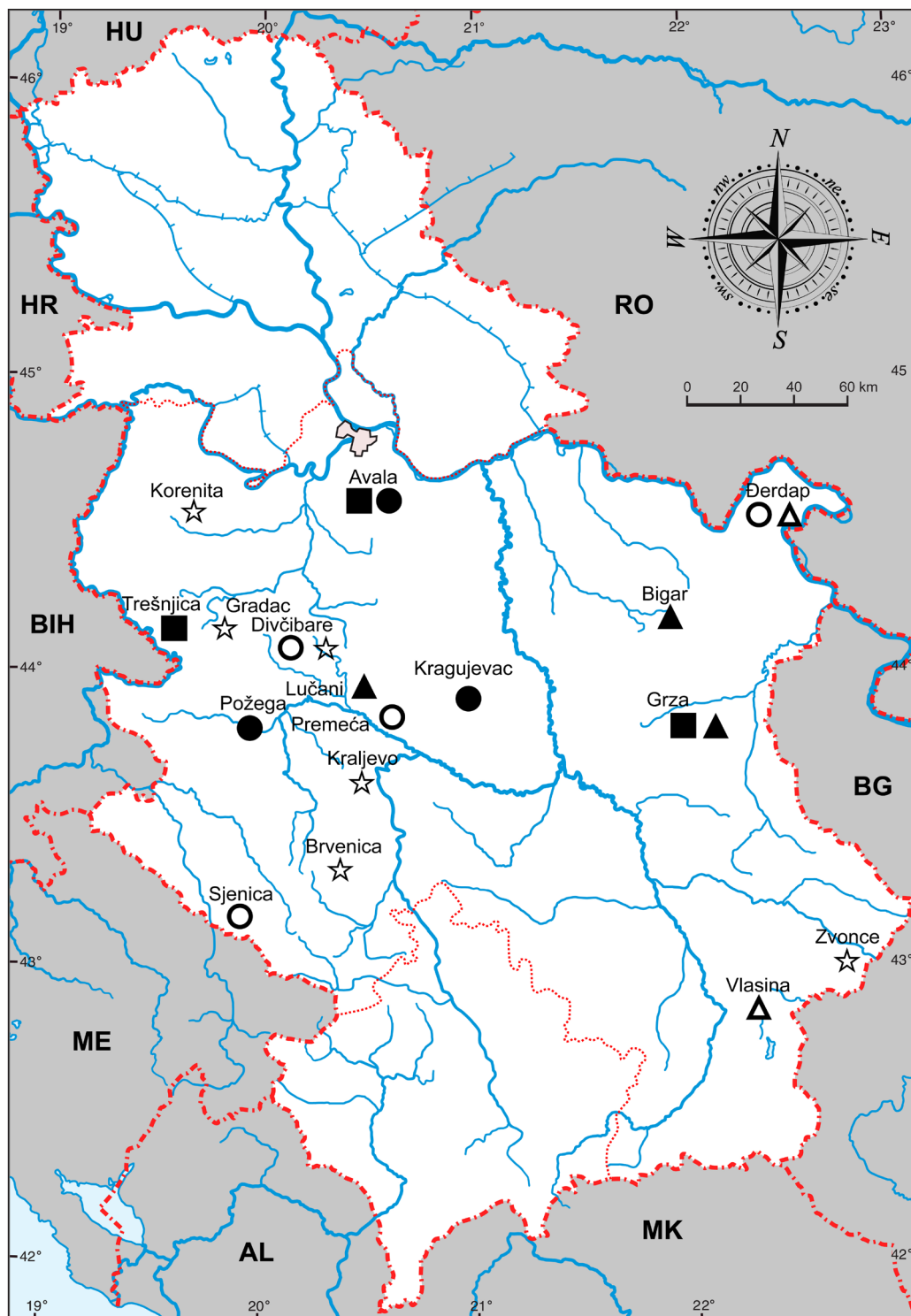
Klupka jaja rodova *Bufo* i *Rana* (Slika 9) se lako razlikuju (Arnold, 2004), dok je taksonomsko razlikovanje jaja mrkih žaba, pogotovo u sintopiji, veoma teško uprkos opisima dostupnim u literaturi (Arnold, 2004). Ubrzo po izleganju, punoglavci mrkih žaba i obične krastače su sitni, tamno obojeni, veoma slične boje i oblika (McDiarmid i Altig, 1999; Arnold, 2004; Ambrogio i Mezzadri, 2014). Prema Ambrogio i Mezzadri (2014), morfološke razlike između punoglavaca *R. dalmatina* i *R. temporaria* na ranim stupnjevima razvića su najviše u obliku repa, dok se rani stupnjevi razvića *B. bufo* i *Rana sp.* međusobno razlikuju po poziciji oka i analnog otvora.



**Slika 9.** Jaja *B. bufo* i *R. dalmatina* (foto: M. Ilić).

### 3.2. Procedure uzorkovanja

Uzorci za analize sakupljeni su od februara do juna tokom perioda 2013 - 2017. godine sa različitih lokaliteta na teritoriji Republike Srbije ili su uzeti iz Batrahološke zbirke Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu (Slika 10; Tabela 2).



**Slika 10.** Geografski prikaz lokaliteta uzorkovanja sa područja Srbije: puni simboli – uzorci (punoglavci i jaja) uključeni u morfometrijske i filogenetske analize, prazni simboli – uzorci (prsti adulta, punoglavci i jaja) uključeni samo u filogenetske analize. Krugovi – *R. dalmatina*, trouglovi – *R. temporaria*, kvadrati – *B. bufo*, zvezde – *R. graeca*.

Uzorci su deponovani na Odeljenju za hidroekologiju i zaštitu voda, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu. Dozvola za sakupljanje je izdata od strane Ministarstva energetike, razvoja i zaštite životne sredine: 353-01-54/2013-08, 353-01-312/2014-08 i od Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine: 353-01-42/2014-08, 353-01-170/2016-17, 353-01-2666/2016-17. Laboratorijski deo studije je odobren od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, dozvola broj No 02-10/16. Obuka za laboratorijsko gajenje punoglavaca je omogućena ljubaznošću Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu.

**Tabela 2.** Uzorci (punoglavci i jaja) korišćeni u morfometrijskim analizama. Uzorci (prsti adulta, punoglavci i jaja *R. graeca* i *R. dalmatina* sakupljeni sa lokaliteta Gradac i Premeća 2014. godine, kao i *R. graeca* i *R. temporaria* sakupljeni sa lokaliteta Korenita, Đerdap i Vlasina 2017. godine) uključeni samo u filogenetske analize nisu tabelarno prikazani.

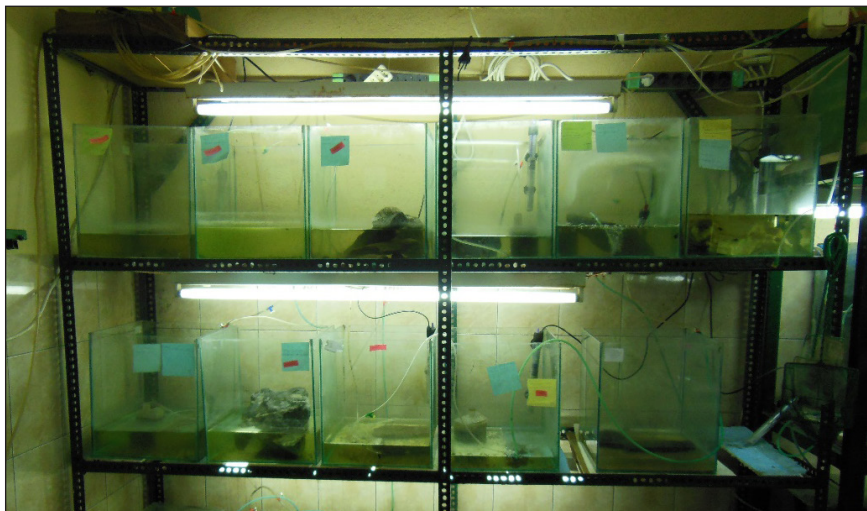
lokalitet	vrsta	broj jedinki/ klupka sakupljeno	broj jedinki analizirano	godina
Trešnjica, reka	<i>B. bufo</i>	10 jedinki	10	2013
Bigar, potok	<i>R. temporaria</i>	10 jedinki	10	2013
Avala, jezero Zuce	<i>R. dalmatina</i>	10 jedinki	10	2013
Avala, jezero Zuce	<i>R. dalmatina</i>	3 klupka	20	2015
	<i>B. bufo</i>	2 klupka	20	
Grza, ribnjaci	<i>R. temporaria</i>	4 klupka	20	2015
	<i>B. bufo</i>	2 klupka	20	
Lučani, Gorobilje	<i>R. temporaria</i>	2 klupka	20	2015
Požega, Moravica	<i>R. dalmatina</i>	1 klupka	10	2015
Kragujevac, Petrovačka reka	<i>R. dalmatina</i>	1 klupko	10	2015
Divčibare, Bela Kamenica	<i>R. graeca</i>	4 klupka	0	2016

Uzorak za preliminarnu analizu metodama tradicionalne morfometrije sakupljen je tokom ranog proleća 2013. godine sa tri lokaliteta u Srbiji, na staništima karakterističnim za mrke žabe (Crnobrnja, 1982; Arnold i Ovenden, 2002; Tomašević i sar., 2008): jezero Zuce na Avali, razlivi potoka Bigar na brdu Bigar, reka Trešnjica u kanjonu reke Trešnjice (Slika 10; Tabela 2). Na svakom lokalitetu, sakupljeno je po 10 jedinki sa istog agregata punoglavaca, standardnom ručnom mrežom i sačuvani su u 70% etanolu. Nakon procedure merenja punoglavaca u laboratoriji, za filogenetske analize uzeti su uzorci tkiva (vrhovi repova) i deponovani u 95% etanolu. Sakupljeni punoglavci su se nalazili na stupnju tzv. ranih punoglavaca, od 23. do 25. stupnja (Gosner, 1960; Tabela 1). Telo punoglavaca je bilo crne boje, a samo su uzorci sakupljeni na lokalitetu Bigar imali vidljive spoljašnje škrge.

Za uporedne i detaljnije morfometrijske analize punoglavaca (metodama tradicionalne i geometrijske morfometrije) klupka jaja su sakupljena tokom proleća 2015. i 2016. godine (Slika 10; Tabela 2). Od februara 2015. godine posećivani su određeni reproduktivni centri *R. dalmatina*, *R. temporaria*, *R. graeca* i *B. bufo*. Na svakom lokalitetu gde je vršeno uzorkovanje, mereni su osnovni fizičko-hemijski parametri (Prilog Tabela 1). Sakupljeno je ukupno 19 klupka jaja koja su transportovana do laboratorije Odeljenja za hidroekologiju i zaštitu voda (Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu) u plastičnim kutijama sa vodom sa lokaliteta i skladištena zasebno u staklenim akvarijumima. Uspešno odgajena klupka (12) korišćena su u daljoj analizi: četiri klupka *R. dalmatina* (dva sa Avale; jedno iz Požege i jedno iz Kragujevca), četiri klupka *R. temporaria* (po dva iz Lučana i Grze) i četiri klupka *B. bufo* (po dva sa Avale i Grze).

### 3.3. Procedure gajenja punoglavaca u laboratorijskim uslovima

Izlegli punoglavci su gajeni u akvarijumima zapremine 160L (dimenzije: 100 cm x 40 cm x 40 cm) i 32L (dimenzije: 35 cm x 31 cm x 30 cm), u kojima je gustina punoglavaca bila okvirno pet punoglavaca po 1,5 litru (Slika 11).



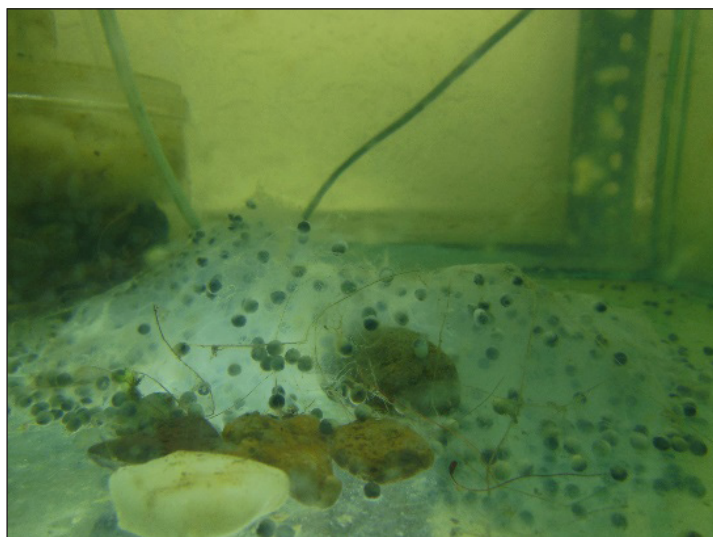
**Slika 11.** Gajenje punoglavaca u laboratorijskim uslovima (foto: M. Ilić).

Punoglavci su hranjeni prokuvanom zelenom salatnom, hranom za zečeve i mlevenom hranom za ribice (Van Buskirk i Relyea, 1998; Grosjean, 2005; Johansson i sar., 2010). Svi akvarijumi su bili opremljeni pumpama za aeraciju, fizičko-hemijski parametri (temperatura, pH, konduktivitet, rastvorene soli) su mereni (Prilog Tabela 2) i akvarijumi su čišćeni redovno, jednom nedeljno. Akvarijumi su bili osvetljeni odgovarajućim lampama i izloženi dnevnim promenama sobne temperature (17°C do 23°C) (Sidorovska i sar., 2002).

Od trenutka kada postanu aktivni plivači, punoglavci (uzorak od 10 jedinki) su sakupljeni nasumice, iz svakog akvarijuma i konzervirani u 10% formalinu (Dayton i sar., 2005; Arendt, 2010). Razvojni stupnjevi konzerviranih punoglavaca su određeni prema Gosneru (1960).

Iz svakog akvarijuma su žrtvovana dodatna 3 punoglavca kako bi se podvrgnuli genetičkoj identifikaciji. Preostali punoglavci iz legla koji nisu iskorišćeni za analize vraćeni su na lokalitet sa kog su jaja prvobitno sakupljena.

Tri klupka (jedno *R. dalmatina* sa lokaliteta jezero Zuce na Avali i dva *R. temporaria* sa lokaliteta Grza, ribnjaci) nisu uspela da se razviju, jer se ubrzo po smeštanju u akvarijume na jajima pojavila plesan *Saprolegnia* sp. (Slika 12). Za ovu gljivicu je poznato da inficira jaja, ali i larve vodozemaca širom sveta (Robinson i sar., 2003; Romansic i sar., 2009).



**Slika 12.** Inficirana jaja vrste roda *Rana* gljivicom *Saprolegnia* sp. (foto: M. Ilić).

Takođe, četiri klupka jaja *R. graeca*, sakupljena na Divčibarama 2016. godine, usled specifičnih uslova koji su neophodni da se jaja ove vrste razviju (na prvom mestu protočna voda, a potom i niska temperatura i dobra aerisanost) nisu uspela da budu odgajena u laboratorijskim uslovima. Postoji mogućnost i da ova jaja nisu bila oplođena ili su bila oštećena u toku transporta od mesta sakupljanja do laboratorije.

### 3.4. Procedure taksonomske genetičke identifikacije

Pored uzoraka laboratorijski gajenih punoglavaca, za procedure taksonomske genetičke identifikacije korišćeni su i dodatni uzorci (jaja, vršni deo repa punoglavca ili vršni deo prsta adultne jedinke) analiziranih vrsta sakupljenih na različitim lokalitetima teritorije Srbije, kao i vršni deo prsta adultnih jedinki iz Batrahološke zbirke Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu (Prilog Tabela 3).

Genetička identifikacija vrsta sakupljenih uzoraka tkiva vršena je DNK barkoding metodom (engl. *DNA barcoding* ili *DNA taxonomy*). DNK barkoding je metoda kojom se vrši identifikacija vrste nekog organizma pomoću kratkih DNK sekvenci određenog gena (Hebert i sar., 2003). Ovaj metod je u širokoj upotrebi u različitim biološkim studijama biljaka (Mallo i Posada, 2016), životinja – beskičmenjaka (Floyd i sar., 2002; Hebert i sar., 2004a) i kičmenjaka (Hebert i sar., 2004b), a najčešće korišćen genetički marker je nukleotidna sekvenca citohrom oksidaza 1 (*COI*) koji se nalazi na mitohondrijalnoj DNK (u daljem tekstu mtDNK). Kod vodozemaca je varijabilnost mtDNK velika, kako unutar tako i između populacija, što predstavlja potencijalni problem u korišćenju DNK barkoding metode. Neki geni su veoma varijabilni (npr. *cox1*), zbog čega se preporučuje njihovo kombinovanje sa različitim markerima i/ili korišćenje konzervativnijih markera (npr. *16S rRNK*, *12S rRNK*, *cytB*). U svojim temeljnim istraživanjima, Vences i sar. (2005a) su utvrdili da je marker *16S rRNK* adekvatniji kada su u pitanju vodozemci, jer su uočili veliku varijabilnost *COI* gena kod ovih organizama.

Kod vodozemaca se, tokom života jedinke, javljaju morfološki veoma različiti stadijumi (jaje, larva, juvenilna jedinka, adulti koji se mogu razlikovati zavisno od pola), pa je za njih DNK barkoding posebno pogodna metoda jer omogućava pouzdanu identifikaciju vrste organizma na svim razvojnim stupnjevima. Kod bezrepih vodozemaca, gde se larva tj. punoglavac, veoma razlikuje od adultne jedinke (McDiarmir i Altig, 1999), DNK barkoding ima posebno veliku primenu (Malkmus i Kosuch, 2000; Ziegler i Vences, 2002; Thomas i sar., 2005, Vences i sar., 2005a, b).

Takođe, DNK barkoding omogućava brzu identifikaciju vrsta i ima primenu u opsežnim ekološkim istraživanjima gde se analize rade na velikom broju jedinki (Vences i sar., 2005a).

U ovoj studiji genetička analiza je obuhvatila 32 uzorka *R. dalmatina*, šest uzoraka *R. graeca*, 19 uzoraka *R. temporaria* i 14 uzoraka *B. bufo*. Ukupno je dobijena 71 sekvenca fragmenta mtDNK *16s rRNK* gena od uzoraka sakupljenih na teritoriji Srbije. Kako bi se dobila adekvatna i prihvatljiva preciznost u filogenetskom klasterovanju, u analizi su korišćene i dostupne sekvence navedenih vrsta iz različitih evropskih zemalja/lokaliteta (DataBase, DDBJ/EMBL/GeneBank) (Prilog Tabela 3).

### 3.4.1. Izolacija ukupne DNK iz tkiva

Tkivo sakupljeno za mtDNK analizu konzervirano je u 95% etanolu (jaja, 5 mm repnog mišića punoglavca ili vršni deo prsta adulta). Neposredno pre procesa izolacije DNK, tkiva su sasušena na sahatnom staklu kako bi etanol potpuno ispario. Izolacija ukupne DNK je urađena pomoću kita *AccuPrep Genomic* (engl. *AccuPrep Genomic DNA Extraction kit*, Bioneer Corporation, Daejeon, R. Koreja), a prema uputstvu proizvođača.

Svaki uzorak tkiva je stavljen pojedinačno u sterilnu, obeleženu tubicu zapremine 2 ml i usitnjavan je mehaničkim putem pomoću sterilnih nožića ili homogenizera (za svaki uzorak se uzima novi nožić/homogenizer). Potom je dodat pufer za ćelijsku lizu (200 µl), a zatim i proteinaza K (20 µl) kojom su uklonjeni proteini iz rastvora. Nakon snažnog mešanja na vorteksu, uzorak se inkubirao 30 minuta (za izolaciju DNK iz jajeta ili punoglavca) ili sat vremena (za izolaciju DNK iz vršnog dela prsta adulta) na temperaturi od 60°C, uz mešanje na svakih 10 minuta. Nakon toga, u tubice je dodat odgovarajući pufer (engl. *binding buffer*) koji vezuje DNK za filter (200 µl), uzorci su mešani na vorteksu i ponovo inkubirani 10 minuta na temperaturi od 60°C. Rastvor se zatim na sobnoj temperaturi mešao sa hladnim izopropanolom (100 µl) da bi došlo do precipitacije DNK. Potom je DNK rastvor nanet na kolone od nitroceluloze koje vezuju specifično nukleinske kiseline, a zatim se centrifugirao. Filter je ispiran dva puta odgovarajućim rastvorom (engl. *washing buffer*) (svaki put sa po 500 µl rastvora) kako bi se uklonili proteini, lipidi, soli i ostale ćelijske komponente. Uzorak se ponovo centrifugirao, a potom se sa filtera spirala DNK pomoću specifičnog elucionog pufera, u količini od 30 do 100 µl zavisno od tipa uzorka, odnosno početne količine tkiva. Za izolaciju DNK iz dela prsta korišćeno je najviše 30 µl, a za izolaciju DNK iz punoglavca ili jaja zapremine elucionog pufera je bila do 100 µl. Prosečna koncentracija izolovane DNK iz različitih uzoraka je iznosila: 6,300 ng/µl (iz jajeta), 14,467 ng/µl (iz uzoraka izolovanih iz repa punoglavca), i 10,400 ng/µl (iz uzoraka izolovanih iz vršnog dela prsta adultne jedinke).

### 3.4.2. Uslovi za PCR amplifikaciju željenog fragmenta mtDNK

Rastvor za lančanu reakciju polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) je sadržao sledeće sastojke: 1) voda (26 µl); 2) PCR pufer (5x) (10 µl); 3) magnezijum hlorid, MgCl<sub>2</sub> 25 mM (5 µl); 4) dezoksiribonukleotidi, dNTP 10 mM (2 µl); 5) prednji prajmer (engl. *forward primer*, F), 16SA-F, 20 µM (1 µl); 6) reverzni ili suprotni prajmer (engl. *reverse primer*, R), 16SB-R, 20 µM (1 µl); 7) GoTaq®Hot Start *Taq* polimeraza (1,5 µl IU/reakciji). Za PCR smešu ukupne zapremine 50 µl, ovi sastojci čine 45 µl + 5 µl DNK uzorka.

Uzorak je zatim amplifikovan (umnožen) PCR reakcijom sa univerzalnim prajmerima za amplifikaciju ciljanog regiona *16S rDNK* gena (parovi prajmera pokrivaju okvirno 560 bp) dužine oko 560 bp: F prajmer 16SA-F: 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' i R prajmer 16SB-R: 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3' koji su opisani u Veith i sar. (2003). PCR je izvršen u aparatu *MultiGene OptiMax Thermal Cycler*, pomoću sledećeg termalnog profila: primarna denaturacija koja je trajala 5 minuta na temperaturi od 94°C, praćena sa 38 ciklusa denaturacije (30 s na 94°C), hibridizacije prajmera (30 s na 52°C) i elongacije DNK (40 s na 72°C), nakon čega je usledila finalna elongacija (5 minuta na 72°C).

Obzirom da su korišćeni univerzalni prajmeri, posebna pažnja je posvećena održavanju sterilnih uslova kako ne bi došlo do kontaminacije. Kontrolisanje eventualne kontaminacije rađeno je pomoću amplifikacije negativne kontrole za svaku PCR analizu sa destilovanom vodom kao uzorkom.

Pre nukleotidnog sekvenciranja, dobijeni amplikoni su proveravani na horizontalnom sistemu za elektroforetsko razdvajanje sa 2% agaroznim gelom. Za elektroforezu je korišćen TBE pufer, a u gel je dodato 6,5 µl rastvora etidijum bromida na 100 ml ukupne zapremine gela kako bi se trake DNK vizuelizovale. Gelovi sa dobijenim DNK amplikonima su snimani i arhivirani na *BioRad GelDoc* sistemu za snimanje gelova.

Nakon provere na 2% agaroznom gelu, PCR amplikoni su prečišćeni upotrebom *MinElute Spin* kolone i centrifugiranjem kako bi se dobila DNK adekvatne čistoće i koncentracije za dalje analize. Za ovaj postupak je korišćen *MinElute PCR purification kit* (QIAGEN, USA, [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)). Centrifugiranje se izvodilo na sobnoj temperaturi u konvencionalnim centrifugama na  $\geq 10\,000$  xg.

### 3.4.3. Određivanje nukleotidne sekvence dobijenih amplikona

Prečišćeni, amplifikovani fragmenti poslani su na automatsko sekvenciranje koje je vršeno u oba smera. Amplikoni M1 do M9 i M11 su sekvencirani pomoću *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-a* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), a dobijene sekvence su očitane i složene upotrebom ABI programa: *Sequencing Analysis 5.1* i *SeqScape software*, v. 2.5. Sekvenciranje je omogućeno ljubaznošću saradnika Laboratorije za virusologiju, Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Preostali amplifikovani fragmenti DNK (M11 do M84) su poslani na uslužno sekvenciranje u kompaniju *MacroGen* (Amsterdam, Holandija). Rezultati automatskog sekvenciranja su dobijeni u vidu slovnog i grafičkog zapisa, tj. elektroferograma.

Zavisno od vrste, dobijeni fragment se sastojao od 568 do 608 bp mitohondrijalnog *16S rRNK* gena. Elektroferogrami dobijenih sekvenci (koje su analizirane u oba pravca, engl. *forward* i *reverse*), ispitivani su u programu Finch TV, v.1.4.0 (<http://www.geospiza.com>) kako bi se proverio redosled očitanih baza u dobijenoj sekvenci i eventualno korigovale nepravilnosti na osnovu vizuelne inspekcije i poređenja sekvenci u oba smera očitavanja. Dobijene nukleotidne sekvence su deponovane u *GenBank* bazu podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) sa prijavnim brojevima KR136355 - KR136364 i MH791090 - MH791150. Nukleotidne sekvence dobijene u ovom radu kao i nukleotidne sekvence koje su za analizu preuzete iz *GenBank* baze podataka navedene su u Prilogu Tabele 3.

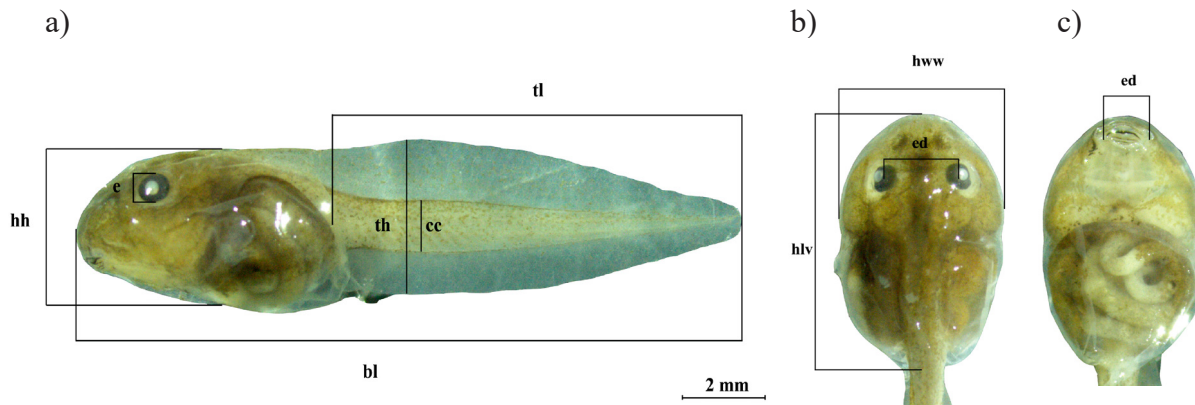
### 3.4.4. Filogenetska analiza za identifikaciju vrste organizama i određivanje genetičke distance na osnovu sekvenciranih fragmenata mtDNK

*ClustalW* (Thompson i sar., 1994) integrisan u program MEGA v.7.0 (Kumar i sar., 2016) je korišćen za poravnavanje (engl. *alignment*) svih sekvenci koje su takođe vizuelno pregledane u programu *Bioedit* (Hall, 1999). Najpodesniji statistički model za konstrukciju filogenetskog stabla je dobijen u programu *JModelTest* v.2.1.10 (Guindon i Gascuel, 2003; Darriba i sar., 2012). Filogenetsko stablo je konstruisano u programu MEGA v.7.0 (Kumar i sar., 2016) metodom „najveće verovatnoće” (engl. *Maximum likelihood*, ML). Verovatnoća topologije filogenetskog stabla testirana je *bootstrap* metodom. Za ukorenjivanje stabla kao *outgroup* takson korišćena je vrsta *Hyla ussuriensis*, čija je sekvenca preuzeta iz baze *GeneBank* (ID broj/prijavni broj KT964710). U cilju preglednosti stabla, identične sekvence dobijene u ovoj analizi nisu upotrebljene za konstrukciju filogenetskog stabla (Prilog Tabela 3).

Inter- i intraspecijske genetičke distance za uzorke laboratorijski gajenih punoglavaca koji su korišćeni u morfometrijskim analizama računane su u programu PAUP v.4.0b (Swofford, 2003). U istom programu, konstruisano je stablo pomoću metoda „*neighbour joining method*” (NJ), na osnovu kog su računane genetičke distance. Za pravljanje stabla korišćen je model test dobijen u programu *JModelTest* v.2.1.10 (Guindon i Gascuel, 2003; Darriba i sar., 2012).

### 3.5. Procedure morfološke diferencijacije punoglavaca primenom tradicionalne morfometrije

Za preliminarnu analizu metodama tradicionalne morfometrije, po 10 punoglavaca *R. dalmatina*, *R. temporaria* i *B. bufo* sakupljeno je sa tri različita lokaliteta u Srbiji (Slika 10; Tabela 2). Za potrebe fotografisanja svaki punoglavac je postavljen u isti položaj u petri šolji, pri čemu je povremeno prelivan vodom kako se jedinka ne bi isušila i posmatran je binokularom Carl Zeiss, Stemi 2000-C sa uvećanjem 6,5 x. Punoglavac je fotografisan sa dorzalne, lateralne i ventralne strane digitalnom kamerom AxioCamERc 5s, dok su programi Zeiss, ZEN 2011 i ImageJ (Abramoff i sar., 2004) korišćeni za linearna merenja. Linearni karakteri koji su mereni i korišćeni za analize izabrani su u skladu sa dostupnom literaturom (Van Buskirk i Relyea, 1998; Dey i Gupita, 2002; Sidorovska i sar., 2002; Vences i sar., 2002; Grosjean, 2005; Vejarano i sar., 2006; Altig, 2007; Arendt, 2010; Di Cerbo i Biancardi, 2010; Severtsova i sar., 2012; Johansson i Richter-Boix, 2013). Set izabranih linearnih mera (Slika 13) je uključivao: ed – razmak između očiju, hh – visina glave, e – prečnik oka, tl – dužina repa, cc – visina repnog mišića, th – visina repa, m – dužina usta, hww – širina glave, hlv – dužina glave i bl – dužina tela. Sve dobijene mere su podeljene dužinom tela (bl) kako bi se dobile standardizovane vrednosti za dalje analize (ED – razmak između očiju, HH – visina glave, E – prečnik oka, TL – dužina repa, CC – visina repnog mišića, TH – visina repa, M – dužina usta, HWV – širina glave, HLV – dužina glave).



**Slika 13.** Prikaz linearnih mera analiziranih punoglavaca. a) lateralno; b) glava dorzalno; c) glava ventralno (foto: M. Ilić).

Normalnost podataka je testirana *Shapiro-Wilk* testom (Shapiro i Wilk, 1965), koji je namenjen za uzorke manje brojnosti ( $n < 50$ ). Od parametara deskriptivne statistike izračunate su srednje vrednosti, minimumi, maksimumi i medijane analiziranih varijabli za date vrste. Levinovim testom testirana je homogenost varijanse podataka (Levene, 1960), dok je Boks test jednakosti kovarijansi (Box, 1949) korišćen za procenu homogenosti kovarijanse matrica.

Jednofaktorskom analizom varijanse (engl. *Analysis of variance*, ANOVA) sa kontrastima analizirana je razlika srednjih vrednosti merenih varijabli između vrsta. Pirsonova korelacija se koristila kako bi se utvrdila korelacija između analiziranih varijabli. Varijable koje nisu pokazale korelisanost isključene su iz dalje multivarijantne analize. Kanonijskom diskriminantnom analizom (engl. *Canonical Discriminant Analysis*, CDA) je ustanovljeno koje varijable najviše doprinose diskriminaciji analiziranih vrsta i vizuelno je prikazano njihovo razdvajanje. Odnos varijabli koje



najviše doprinose razdvajanju vrsta dalje je ispitivan linearnom regresijom (Young i Young, 1998; Quinn i Keough, 2002; Simonović, 2004; Hair i sar., 2010; Ivanović i Kalezić, 2013).

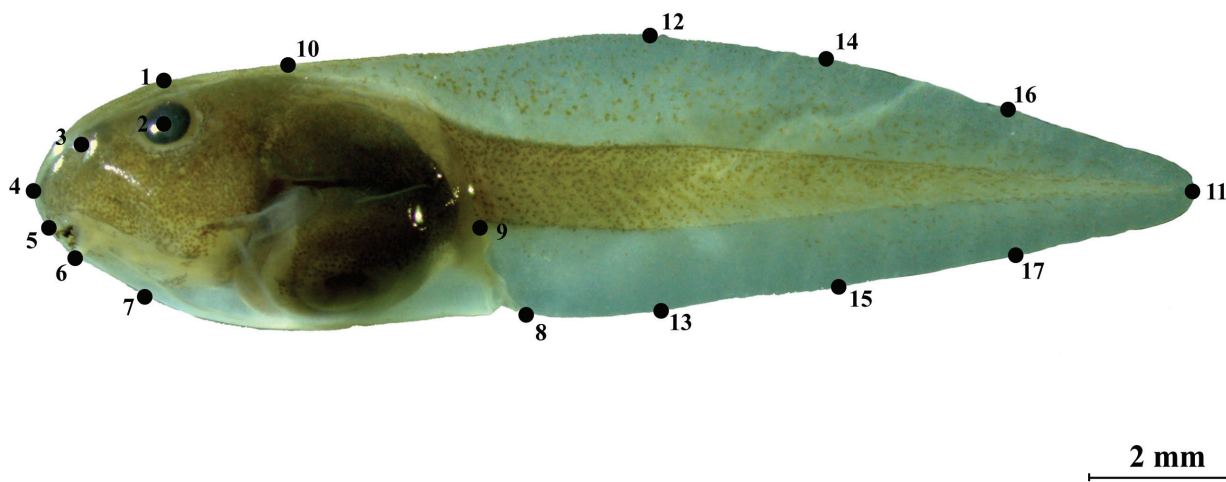
Podaci su analizirani u programskom paketu Statistica 7.0 (StatSoft, 2004).

### 3.6. Uporedna (geometrijska vs. tradicionalna) morfometrijska analiza varijabilnosti punoglavaca

Za detaljnu analizu morfološke varijabilnosti punoglavaca *R. dalmatina*, *R. temporaria* i *B. bufo* na ranim stupnjevima razvića korišćene su tradicionalna i geometrijska morfometrija, a testirana je i njihova efikasnost u morfološkoj diferencijaciji ranih larvenih stadijuma. Preciznije, analizirana je varijabilnost u veličini i obliku laboratorijski gajenih punoglavaca vrsta *R. dalmatina*, *R. temporaria* i *B. bufo* na ranim stupnjevima razvića, od 25. do 29. stupnja (prema Gosneru, 1960). Ukupan uzorak punoglavaca za morfometrijske analize se sastojao od 120 jedinki (po 40 od svake vrste; Slika 10, Tabela 2). Za potrebe analiza, jedinke su fotografisane digitalnom kamerom AxioCamERc 5s, Zeiss, koristeći program ZEN 2011. Svaka jedinka je fotografisana pod istim uslovima, u lateralnom položaju, a iste fotografije su korišćene u analizama i tradicionalne i geometrijske morfometrije.

#### 3.6.1. Metode geometrijske morfometrije

Program tpsDig (Rohlf, 2015a, b) je korišćen kako bi se digitalizovale specifične tačke, odnosno dvodimenzionalne koordinate specifičnih tačaka. Na osnovu prethodnih studija morfološke varijabilnosti punoglavaca primenom metoda geometrijske morfometrije (Dayton i sar., 2005; Ferland-Raymond i Murray, 2008; Arendt, 2010; Johansson i sar., 2010; Haad i sar., 2011; Katzenberger i sar., 2014; Johnson i sar., 2015; Peltzer i sar., 2017), pozicionirano je 17 tačaka na levoj strani tela punoglavca, kao i dve referentne tačke na razmerniku (Slika 14; Tabela 3). Program tpsUtil (Rohlf, 2015b, 2017a) je korišćen kako bi se izvršila manipulacija TPS dokumenata (spajanje fajlova i uređivanje tačaka), a u programu tpsRelw (Rohlf, 2015b, 2017b) je proveravana tačnost digitalizacije.



**Slika 14.** Prikaz rasporeda dvodimenzionalnih tačaka pozicioniranih na levoj strani tela analiziranih punoglavaca (foto: M. Ilić).

**Tabela 3.** Opis 11 od 17 dvodimenzionalnih tačaka pozicioniranih na levoj strani tela analiziranih punoglavaca.

---

1	tačka na glavi iznad centra oka, 90° dorzalno u odnosu na centralnu ravan regije glave
2	centar oka
3	nozdrva
4	vrh njuške
5	prednja ivica gornje usne
6	prednja ivica donje usne
7	tačka na glavi iznad centra oka, 90° ventralno u odnosu na centralnu ravan regije glave
8	analni otvor
9	ventralna ivica repnog mišića na spoju sa glavom
10	dorzalna insercija repnog peraja
11	vrh repa

---

Za detaljnije opisivanje oblika repa, pozicionirano je šest dodatnih tačaka, tako što je povučena linija između tačaka 9 i 11 duž koje su postavljene tri upravne linije na 25%, 50% i 75% udaljenosti. Dodatne tačke (12-17) su pozicionirane na preseccima upravnih linija sa ventralnom i dorzalnom ivicom repa. Da bi se uklonila razlika u obliku koja potiče od položaja repa u odnosu na glavu, konfiguracije specifičnih tačaka su ispravljene korišćenjem opcije “*unbend specimens*” u programu tpsUtil (Rohlf, 2015b, 2017a; Sherratt i sar., 2018). Specifične tačke 4, 9 i 11 su korišćene da se isprave i transformišu konfiguracije.

U programu CoordGen6 (Sheets, 2000) je izvršeno reskaliranje konfiguracija specifičnih tačaka na tačke lenjira i dobijena je informacija o veličini tzv. veličina centroida (engl. *centroid size*, CS) svake jedinice. Generalizovana Prokrustova Analiza (GPA) (Rohlf i Slice, 1990; Dryden i Mardia, 1998; Rohlf, 1999) je korišćena kako bi se u analiziranom uzorku uklonile razlike u veličini, poziciji i orijentaciji konstelacija specifičnih tačaka i dobile varijable oblika tzv. Prokrustove koordinate.

Razlike u veličini punoglavaca među analiziranim vrstama ispitivane su jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) gde je testiran uticaj vrste na veličinu centroida (CS).

Varijabilnost oblika punoglavaca između analiziranih populacija/vrsta se ispitivala analizom glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA), gde su kao varijable oblika korišćene Prokrustove koordinate. Promene oblika punoglavaca duž prve dve PC ose predstavljene su tzv. deformacionim konturnim (engl. *warped outline*) dijagramima (Klingenberg, 2013).

Multivarijantnom analizom kovarijanse (engl. *Multivariate Analysis of Covariance*, MANCOVA) je ispitivana zavisnost oblika od veličine (alometrijski odnosi) između analiziranih vrsta. Za zavisne varijable je uzeto prvih nekoliko PC osa (koje opisuju više od 90 % varijabilnosti oblika), logaritmovana veličina centroida (ln CS) je korišćena kao kovarijabla, a vrsta kao nezavisna varijabla.

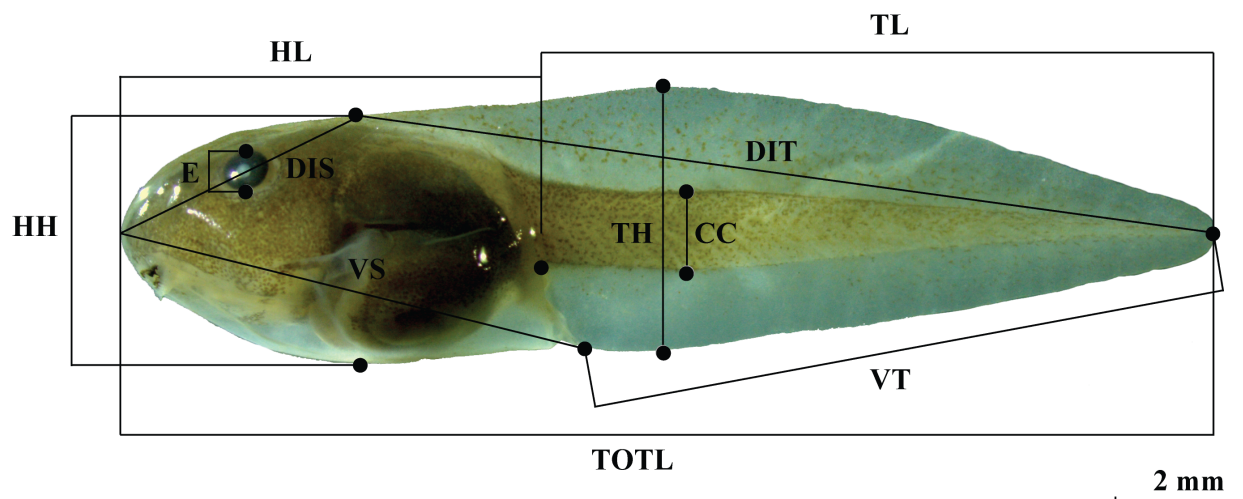
Kako bi se kvantifikovale razlike u obliku punoglavaca analiziranih vrsta izračunate su Mahalanobisove distance (engl. *Mahalanobis distances*, Mds) primenom diskriminantne funkcijske analize (engl. *Discriminant Function Analysis*, DFA). Za procenu statističke značajnosti izračunatih Mahalanobisovih distanci korišćen je permutacioni test (Good, 1994; Edgington, 1995) sa 10 000 ponavljanja, nasuprot nultoj hipotezi da između vrsta nema značajnih razlika u obliku.

Procena korektnosti klasifikacije analiziranih vrsta je vršena primenom engl. *leave-one-out* kros-validacione diskriminantne funkcijske analize (engl. *cross-validated Discriminant Function Analysis*, DFA) (Lachenbruch, 1967; Viscosi i Cardini, 2011; Jojić i sar., 2014).

Analize varijanse i kovarijanse (ANOVA i MANCOVA) su rađene u programu Statistica 7. (StatSoft, 2004), dok su ostale analize vršene pomoću programa MorphoJ (Klingenberg, 2011).

### 3.6.2. Metode tradicionalne morfometrije

U skladu sa prethodnim studijama morfološke varijabilnosti punoglavaca primenom metoda tradicionalne morfometrije (Relyea, 2001; Grosjean, 2005; Alvarez i Nicieza, 2006; Altig, 2007; Arendt, 2010; Hsu i sar., 2011; Lima i Pederassi, 2012), izmereno je deset linearnih mera (Slika 15; Tabela 4; Prilog Tabela 4) korišćenjem programa TMorphGen6, Integrated Morphometrics Program (IMP) serije (Sheets, 2000).



**Slika 15.** Prikaz linearnih mera punoglavaca korišćenih za analize tradicionalnom morfometrijom. Opis linearnih mera dat je u Tabeli 4 (foto: M. Ilić).

**Tabela 4.** Linearne mere korišćene za tradicionalnu morfometrijsku analizu.

1	HH	visina glave
2	HL	dužina glave
3	E	prečnik oka
4	TH	visina repa
5	TL	dužina repa
6	CC	visina mišića repa
7	VT	rastojanje između analnog otvora i vrha repa
8	DIT	rastojanje između dorzalne insercije repnog peraja i vrha repa
9	DIS	rastojanje između dorzalne insercije repnog peraja i vrha njuške
10	VS	rastojanje između analnog otvora i vrha njuške

Kako bi se otklonio efekat veličine, linearne mere su standardizovane primenom Mosimanove standardizacije/transformacije (engl. *Mosimann's log-shape ratios*) (Mosimann, 1970; Mosimann i James, 1979; Klingenberg, 2016). U prvom koraku Mosimanove transformacije svaka od linearnih mera (varijabli) se deli standardnom merom za veličinu, odnosno geometrijskom sredinom (engl. *geometric mean*, GM) svih varijabli, koja kvantifikuje ukupnu veličinu objekta. U drugom koraku Mosimanove transformacije, dobijene vrednosti se logaritmuju kako bi se dobile ln-transformisane (engl. *ln-transformed*) GM-standardizovane varijable. Ovaj pristup se smatra analognim Prokrustovoj superimpoziciji koja predstavlja metod korekcije veličine koji se primenjuje u geometrijskoj morfometriji. Oba pristupa vrše korekciju izometrijskog efekta veličine na varijabilnost oblika, dok

se zadržava varijabilnost oblika koja potiče od alometrije (Sherratt i sar., 2017). Takođe, umesto geometrijske sredine (GM) svih varijabli može se koristiti kako bilo koja originalna linearna mera, tako i aritmetička sredina svih varijabli (Klingenberg, 2016).

Statističke razlike u veličini punoglavaca analiziranih vrsta ispitivane su primenom dve jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) kojima je testiran uticaj analizirane vrste kao nezavisne varijable na varijabilnost ukupne veličine kao zavisne varijable. U prvoj ANOVA analizi kao mera ukupne veličine punoglavca korišćena je geometrijska sredina (GM) svih varijabli, dok je u drugoj ANOVA analizi kao mera ukupne veličine korišćena ukupna dužina punoglavca (TOTL) (Slika 15). Dodatno, primenom jednofaktorske analize varijanse i Bonferoni korekcije procenjen je uticaj analizirane vrste punoglavca na varijabilnost svake GM-standardizovane varijable.

Analiza glavnih komponenti (PCA) svih ln-transformisanih GM-standardizovanih varijabli primenjena je kako bi se ispitala varijabilnost oblika punoglavaca analiziranih populacija/vrsta.

Za ispitivanje udela alometrije u varijabilnosti oblika urađene su dve multivarijantne analize kovarijanse (MANCOVA), gde je za zavisne varijable uzeto prvih nekoliko PC osa (koje opisuju više od 90% ukupne varijabilnosti oblika), a vrsta je korišćena kao nezavisni faktor. Vrednosti ln GM i ln TOTL su korišćene kao kovarijable u prvoj, odnosno drugoj MANCOVA analizi.

Na osnovu seta ln-transformisanih GM-standardizovanih varijabli izračunate su kvadratne Mahalanobisove distance (Mds) kao mere razlika u obliku između analiziranih vrsta.

Korektnost klasifikacije analiziranih vrsta procenjena je engl. *leave-one-out* kros-validacionom diskriminantnom funkcijskom analizom (DFA) (Lachenbruch, 1967; Viscosi i Cardini, 2011; Jojić i sar., 2014).

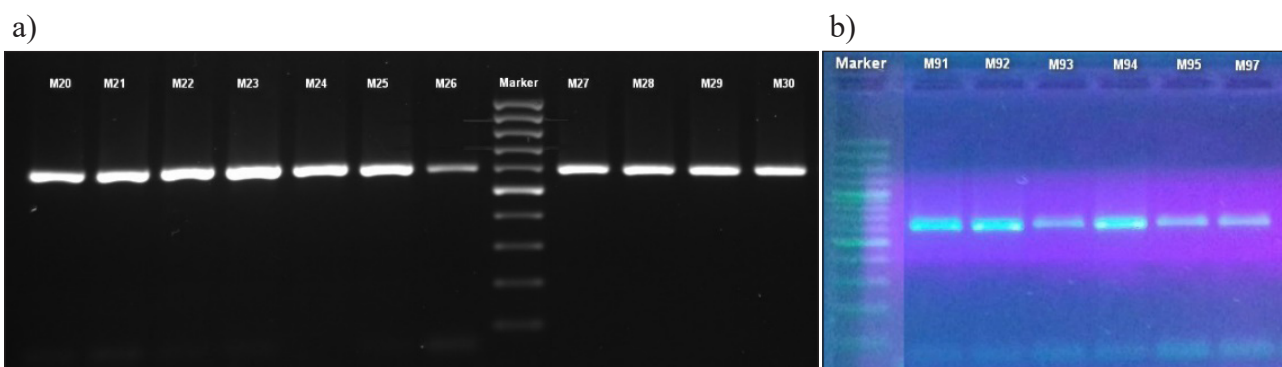
Analize varijanse i kovarijanse (ANOVA i MANCOVA), PCA i računanje Mds je rađeno u programu Statistica 7.0 (StatSoft, 2004), dok je DFA izvršena u programu SPSS 21.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, 2013. Armonk, NY: IBM Corp).

## **4. REZULTATI**

## 4.1. Taksonomska genetička identifikacija i genetička varijabilnost

### 4.1.1. Filogenetska analiza

Nakon PCR amplifikacije, koncentracija dobijenih amplikona je proveravana na 2% agaroznom gelu. U svim reakcijama dobijena je zadovoljavajuća koncentracija amplikona za dalju analizu nukleotidnim sekvenciranjem (Slika 16).



**Slika 16.** Provera efikasnosti PCR amplifikacije na gelu. a) amplikoni iz uzorka punoglavca; b) amplikoni iz prsta adulta (foto: G. Stamenković).

U filogenetskoj analizi, finalan set poravnatih sekvenci koje su korišćene za konstrukciju filogenetskog stabla se sastojao od 104 sekvence (71 sekvence dobijene u ovoj studiji i 33 sekvence preuzete iz *GenBank* baze; Prilog Tabela 3).

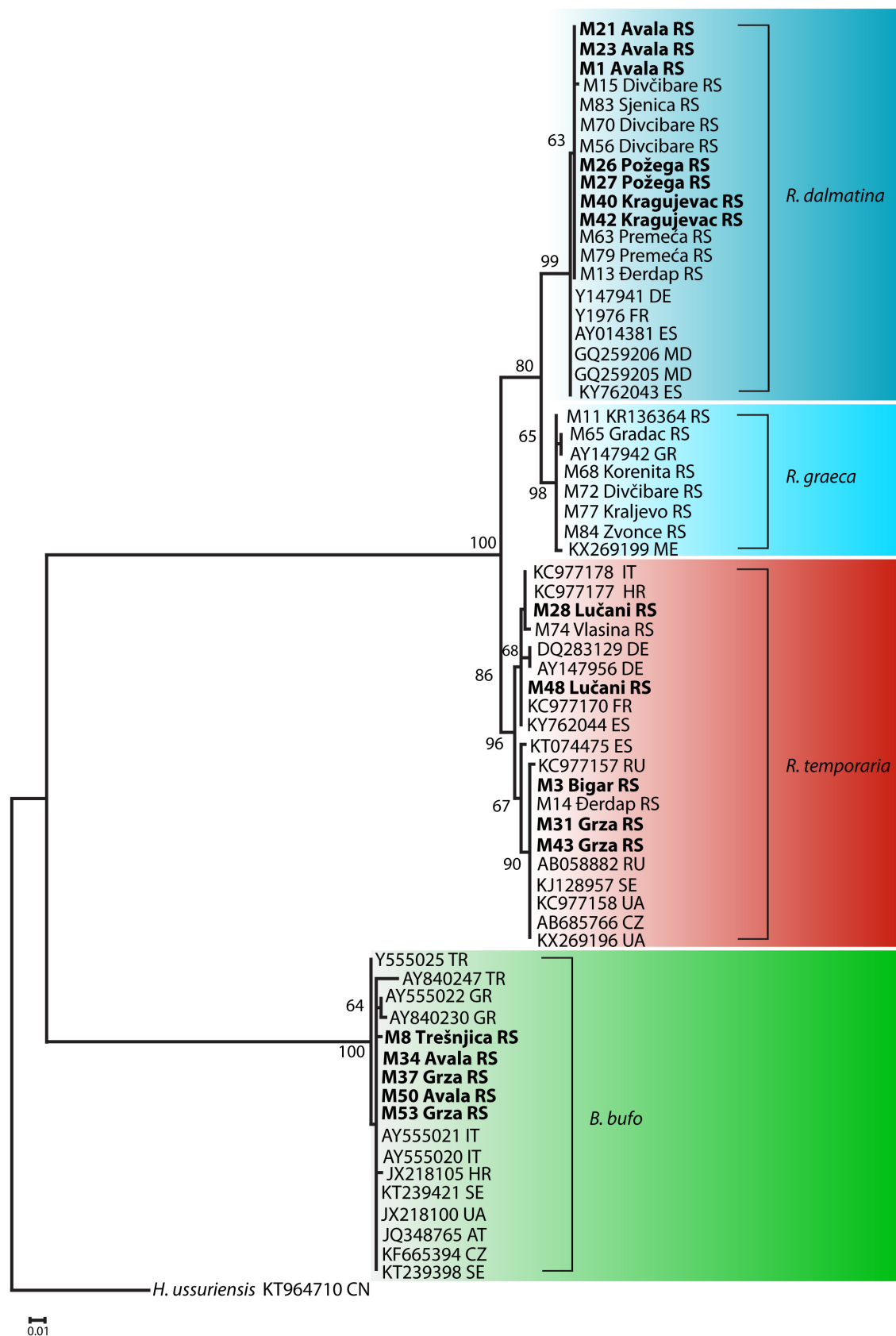
Sekvence dobijene u ovoj studiji su deponovane u *GenBank* bazu sa ID brojevima KR136355 – KR136364 (radni nazivi uzoraka M1 do M9 i M11) i MH791097 – MH791150 (radni nazivi uzoraka M11 do M84, Prilog Tabela 3) (Ilić i sar., 2016, 2019).

Poravnavanjem sekvenci u programu Bioedit, uočene su identične *16S rRNA* sekvence, koje zbog preglednosti nisu prikazane na grafikonu filogenetskog stabla. Za vrstu *R. dalmatina* identične sekvence su: RD\_M1 = RD\_M2 = RD\_M5; RD\_M15 = RD\_M16 = RD\_M17 = RD\_M18; RD\_M21 = RD\_M20 = RD\_M22 = RD\_M24; RD\_M26 = RD\_M25; RD\_M40 = RD\_M41; RD\_M56 = RD\_M55 = RD\_M57; RD\_M70 = RD\_M71. Za vrstu *R. temporaria* identične sekvence su: RT\_M3 = RT\_M6 = RT\_M7; RT\_M28 = RT\_1\_19 = RT\_1\_20 = RT\_M29 = RT\_M30; RT\_M31 = RT\_M32 = RT\_M33; RT\_M43 = RT\_M44 = RT\_M45; RT\_M48 = RT\_M46 = RT\_M47. Za vrstu *B. bufo* identične sekvence su: BB\_M8 = BB\_M4 = BB\_M9; BB\_M34 = BB\_M35 = BB\_M36; BB\_M37 = BB\_M39; BB\_M50 = BB\_M49 = BB\_M51; BB\_M52 = BB\_M53 = BB\_M54.

Posle pažljivog pregleda dobijene sekvence *16S rRNA* gena (dužine 499 – 608 bp) su skraćene i analizirana dužina sekvenci je iznosila 373 bp. Model testom je utvrđen Tamura-Nei model (Tamura i Nei, 1993) sa gama distribucijom (TN93+G) kao najbolji, a *maximum likelihood* metodom je dobijeno stablo sa dobrom podrškom za analizirane vrste (Slika 17).

Na stablu su jasno definisane dve subklade: jedna za rod *Rana* i druga za *B. bufo*. Unutar *Rana* klade diferencirale su se dve grane: *R. temporaria* subklada i subklada sa odvojenim granama za uzorke vrsta *R. dalmatina* i *R. graeca*. Unutar *R. dalmatina* grupe uzoraka, uzorci iz Srbije su se izdvojili u jedan klaster zajedno sa uzorcima iz Nemačke, Francuske, Španije i Moldavije. Subklada *R. temporaria* se sastojala iz dve glavne grupe: jednu su formirali uzorci iz zapadne i jugoistočne Srbije (M28, M74 i M48) zajedno sa uzorcima iz Italije, Hrvatske, Nemačke, Francuske i Španije, dok su drugu grupu obrazovali uzorci iz istočne Srbije (M3, M14, M31 i M42), Rusije, Švedske, Ukrajine, Češke i Španije.

Klada koju čine uzorci *B. bufo* je dobro definisana na stablu (*bootstrap* vrednost 100%). Sekvence dobijene analizom uzoraka iz Srbije su pokazale veliku sličnost sa ostalim *B. bufo* sekvencama preuzetim iz baze (Italija, Turska, Grčka, Hrvatska, Ukrajina, Austrija, Češka, Švedska).



**Slika 17.** Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu sekvenci *16S RNA* gena analiziranih uzoraka. Obeležene sekvence (**bold**) odgovaraju uzorcima koji su korišćeni u morfometrijskoj analizi. Stablo je dobijeno metodom „najveće verovatnoće” sa TN93+G modelom. Brojevi iznad grana predstavljaju statističku podršku.



#### 4.1.2. Inter- i intraspecijske genetičke distance

Model testom je utvrđeno da je TIM2 model (engl. *Transition model 2*) najbolji za konstruisanje NJ stabla, na osnovu koga su računane genetičke distance u programu PAUP. Inter- i intraspecijske genetičke distance kao i standardne devijacije (SD) izračunate su za uzorke laboratorijski gajenih punoglavaca koji su uporedno analizirani metodama geometrijske i tradicionalne morfometrije.

Najveća interspecijska genetička distanca je između *B. bufo* i *R. temporaria* sekvenci (srednja vrednost  $\pm$  SD = 0,1982  $\pm$  0,0072), zatim između *B. bufo* i *R. dalmatina* (srednja vrednost  $\pm$  SD = 0,1887  $\pm$  0,0036). Najmanja distanca je bila između *R. dalmatina* i *R. temporaria* (srednja vrednost  $\pm$  SD = 0,0464  $\pm$  0,0036).

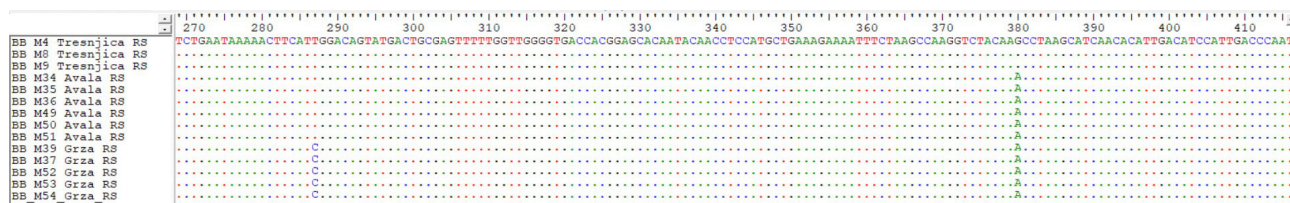
Srednja vrednost intraspecijske genetičke distance je bila najveća kod *R. temporaria* (srednja vrednost  $\pm$  SD = 0,006  $\pm$  0,005), zatim kod *B. bufo* (srednja vrednost  $\pm$  SD = 0,001  $\pm$  0,001), dok su kod *R. dalmatina* sekvence pokazale najmanju varijabilnost (srednja vrednost  $\pm$  SD = 0,000  $\pm$  0,000).

Izračunata najveća srednja vrednost intraspecijske distance kod vrste *R. temporaria* je uočena i analizom u programu Bioedit (Slika 18). Varijabilne nukleotidne pozicije se nalaze na šest lokusa u setu poravnatih sekvenci, a uočava se i da sekvence klasteruju prema razlikama u one poreklom iz zapadne i jugoistočne Srbije (Lučani, Vlasina) i one iz istočne Srbije (Bigar, Grza, Đerdap) (Slika 17).



Slika 18. Izgled poravnatih sekvenci sa varijabilnim lokusima u programu BioEdit kod vrste *R. temporaria*.

Kod *B. bufo* varijabilni lokusi se uočavaju na dva mesta kod poravnatih sekvenci (Slika 19).



Slika 19. Izgled poravnatih sekvenci sa varijabilnim lokusima u programu BioEdit kod vrste *B. bufo*.

## 4.2. Morfološka diferencijacija punoglavaca

Pregledanjem punoglavaca gajenih u laboratoriji pod binokularom, uočene su deformacije na repu („S forma” i nepravilan oblik peraja repa) koje su se javljale kod oko 1,9 % punoglavaca vrsta roda *Rana* (Slika 20).



**Slika 20.** Deformacije na repu punoglavca. a) „S deformacija” repa kod vrste *R. dalmatina*; b) nepravilni oblici repnog peraja kod vrste *R. temporaria* (foto: M. Ilić).

Punoglavci na kojima su uočeni deformiteti nisu korišćeni u daljim morfometrijskim analizama.

### 4.2.1. Morfološka diferencijacija punoglavaca primenom metoda tradicionalne morfometrije

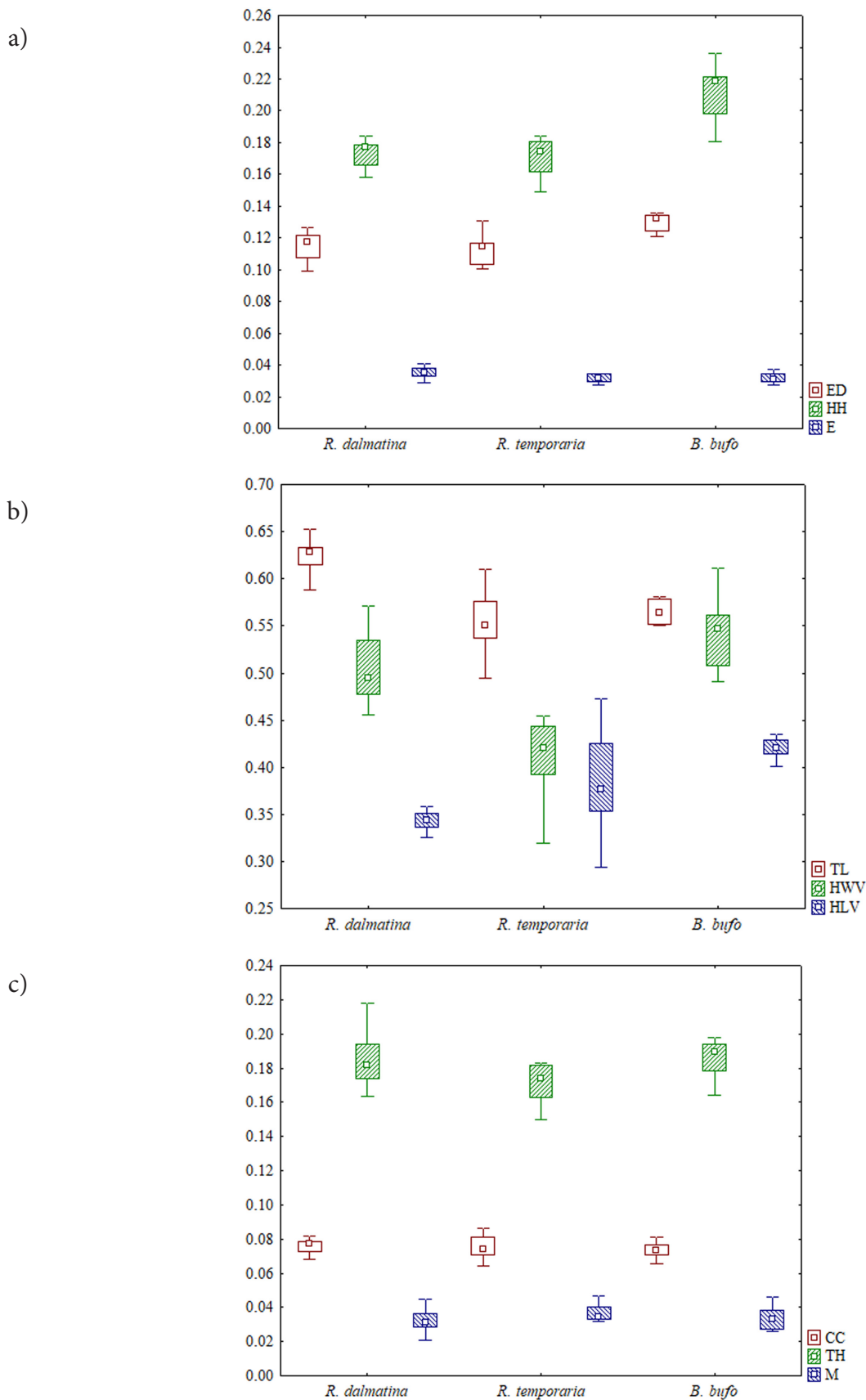
Izmerene linearne mere (ed – razmak između očiju, hh – visina glave, e – prečnik oka, tl – dužina repa, cc – visina repnog mišića, th – visina repa, m – dužina usta, hwv – širina glave i hlv – dužina glave) su standardizovane deljenjem sa ukupnom dužinom tela (bl) kako bi se dobile vrednosti za dalje analize (ED, HH, E, TL, CC, TH, M, HWV i HLV). Pošto je uzorak jedinki koji se analizirao manji od 50, primenjen je *Shapiro-Wilk's* test kako bi se proverila normalnost raspodele podataka. U testiranom setu podataka, dobijena *p* vrednost je bila veća nego odabrana alfa vrednost ( $\alpha = 0,05$ ), što ukazuje da analizirani podaci imaju normalnu raspodelu.

U rezultatima deskriptivne statistike (Slika 21) uočavaju se slične vrednosti ED (razmak između očiju) i HH (visina glave) analiziranih *Rana* vrsta u odnosu na *B. bufo*.

Varijable TL (dužina repa), HLV (dužina glave) i pogotovu HWV (širina glave) se razlikuju kod sve tri analizirane vrste. Vrednosti prečnika oka (E), visine repa (TH), visine repnog mišića (CC) i dužine usta (M) bile su relativno slične kod sve tri vrste.

Testovi homogenosti (Levinov test i Box M test) su pokazali jednakost varijansi za sve testirane varijable osim za varijablu HLV (dužina glave).

Da bi se testirala statistička značajnost razlika srednjih vrednosti standardizovanih varijabli između analiziranih vrsta primenjena je jednofaktorska ANOVA sa kontrastima, čiji su rezultati predstavljeni u Tabeli 5.



**Slika 21.** Deskriptivna statistika standardizovanih varijabli za analizirane vrste. a) ED, HH, E; b) TL, HWV, HLV; c) CC, TH, M. Oznake varijabli su: ED – razmak između očiju, HH – visina glave, E – prečnik oka, TL – dužina repa, HWV – širina glave, HLV – dužina glave, CC – visina repnog mišića, TH – visina repa, M – dužina usta.

**Tabela 5.** Rezultati testa jednofaktorske ANOVA sa kontrastima (označene su značajne razlike za  $P < 0,05$ ). *Estimate* – Procenjena srednja vrednost; *Std. Err* – Standardna greška; *t* – t vrednost; *P* – p vrednost; *Cnf. Lmt* (-95%), *Cnf. Lmt* (+95%) – intervali poverenja za srednju vrednost. Varijable čije se srednje vrednosti statistički značajno razlikuju ( $P < 0,05$ ) među ispitivanim vrstama su označene (**bold**).

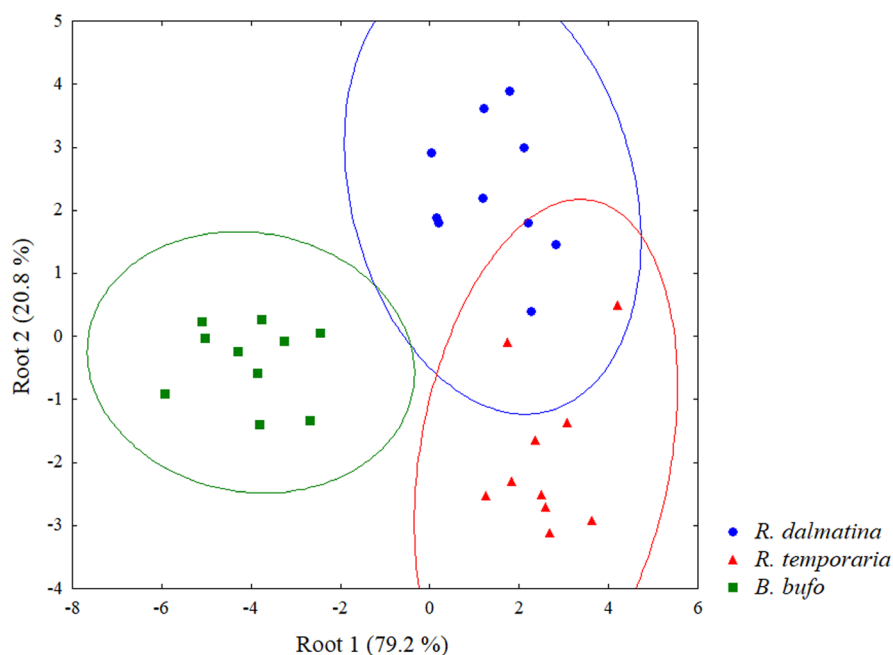
	<i>Estimate</i>	<i>Std. Err</i>	<i>T</i>	<i>P</i>	<i>Cnf. Lmt. (-95%)</i>	<i>Cnf. Lmt. (+95%)</i>
<b>ED</b>	-0,032690	0,006351	-5,14736	<b>0,000021</b>	-0,045721	-0,019659
<b>HH</b>	-0,085195	0,011152	-7,63957	<b>0,000000</b>	-0,108077	-0,062314
E	0,003240	0,003502	0,925069	0,363125	-0,003946	0,010425
<b>TL</b>	0,047562	0,017595	2,703096	<b>0,011736</b>	0,011459	0,083665
CC	0,005678	0,004581	1,239504	0,225825	-0,003721	0,015078
TH	-0,016355	0,010192	-1,60466	0,120203	-0,037267	0,004558
M	0,002175	0,005979	0,363826	0,718821	-0,010092	0,014443
<b>HWV</b>	-0,156075	0,037526	-4,15910	<b>0,000290</b>	-0,233073	-0,079078
<b>HLV</b>	-0,106239	0,025620	-4,14680	<b>0,000300</b>	-0,158806	-0,053672

Pre primene multivarijantnih analiza izračunate su Pirsonove korelacije kako bi se iz dalje analize izuzeli nekorelisani parametri. Prečnik oka (E), visina repnog mišića (CC) i dužina usta (M) nisu pokazale korelisanost, te su bile isključene iz dalje analize (Tabela 6).

**Tabela 6.** Pirsonove korelacije analiziranih varijabli. ED – razmak između očiju, HH – visina glave, E – prečnik oka, TL – dužina repa, CC – visina repnog mišića, TH – visina repa, M – dužina usta, HWV – širina glave, HLV – dužina glave. Označene (**bold**) korelacije su značajne za  $P < 0,05$ .

	<b>ED</b>	<b>HH</b>	E	<b>TL</b>	CC	<b>TH</b>	M	<b>HWV</b>	<b>HLV</b>
<b>ED</b>	1,000								
<b>HH</b>	<b>0,450</b>	1,000							
E	-0,047	0,004	1,000						
<b>TL</b>	-0,314	-0,225	0,121	1,000					
CC	-0,244	-0,114	0,139	0,229	1,000				
<b>TH</b>	0,065	<b>0,365</b>	-0,028	0,300	0,113	1,000			
M	0,135	0,091	-0,344	-0,217	0,142	0,087	1,000		
<b>HWV</b>	0,320	<b>0,576</b>	-0,110	0,211	0,014	<b>0,521</b>	-0,077	1,000	
<b>HLV</b>	<b>0,413</b>	<b>0,453</b>	0,074	<b>-0,384</b>	-0,005	-0,137	0,088	-0,226	1,000

Kompleksni odnosi odabranih morfometrijskih parametara analiziranih uzoraka punoglavaca su predstavljeni u dvodimenzionalnom prostoru prve i druge kanonijske ose (Slika 22). Po prvoj kanonijskoj osi (Root 1) razdvojili su se punoglavci vrste *B. bufo* (grupisani u negativnom delu prve kanonijske ose) od punoglavaca roda *Rana* (raspoređeni u pozitivnom delu prve kanonijske ose). Razdvajanje punoglavaca vrsta roda *Rana* uočava se duž druge kanonijske ose (Root 2).



**Slika 22.** Kanonijska diskriminantna analiza izabranih standardizovanih varijabli (ED – razmak između očiju, HH – visina glave, TL – dužina repa, TH – visina repa, HWV – širina glave, HLV – dužina glave).

Takođe, Kanonijskom diskriminantnom analizom (CDA) utvrđeno je da su HWV (širina glave) i HLV (dužina glave) najinformativniji karakteri za taksonomsko razlikovanje između punoglavaca mrkih žaba i obične krastače, dok je dužina repa (TL) najbitnija karakteristika za razlikovanje punoglavaca dve vrste mrkih žaba (Tabela 7). U Tabeli 8 predstavljene su vrednosti u milimetrima (sirove linearne mere sa svojim opsezima) za ova tri najinformativnija karaktera.

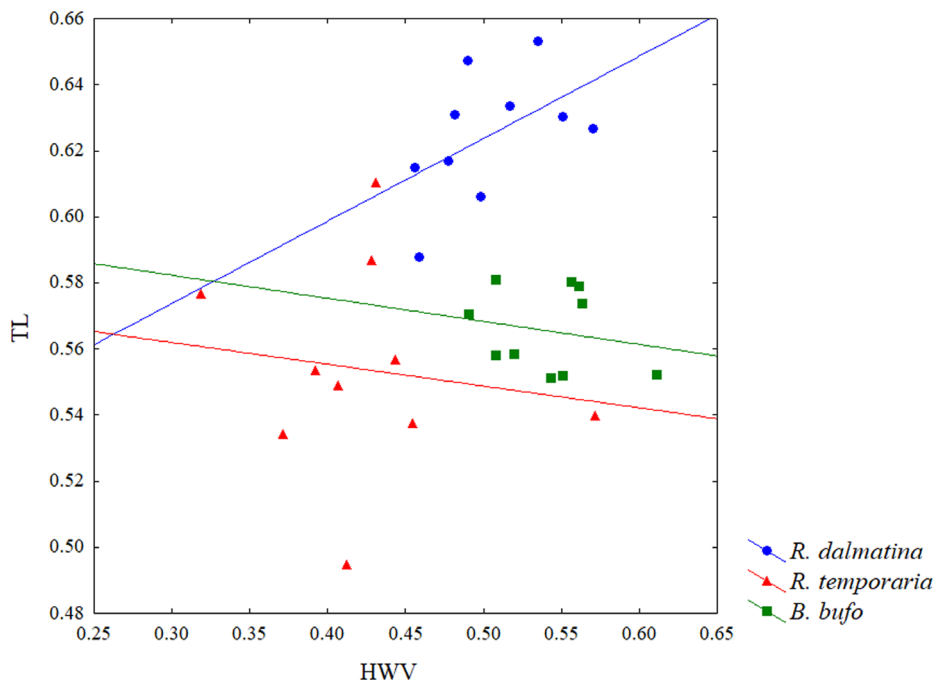
**Tabela 7.** Rezultati Kanonijske diskriminantne analize (CDA). Opterećenja kanonijskih osa; *Eigenval* – sopstvene vrednosti; *Cum. Prop* – kumulativan procenat opisanih razlika između analiziranih vrsta. Označena (**bold**) opterećenja > 0,6.

	<b>Root 1</b>	<b>Root 2</b>
ED	-0,31469	0,480344
HH	-0,27051	-0,075231
<b>TL</b>	-0,19050	<b>1,049517</b>
TH	-0,11888	0,113444
<b>HWV</b>	<b>-0,66539</b>	0,068916
<b>HLV</b>	<b>-0,83712</b>	-0,426270
Eigenval	12,58955	3,311605
Cum. Prop	0,79174	1,000000

**Tabela 8.** Vrednosti u milimetrima (sirove linearne mere sa svojim opsezima) za hl – dužinu glave, hw – širinu glave i tl – dužinu repa. n – veličina uzorka.

<b>Vrsta (n)</b>	<b>hl</b>	<b>hw</b>	<b>tl</b>
<i>R. dalmatina</i> (10)	3,47 – 3,90	1,60 – 2,05	5,92 – 7,29
<i>R. temporaria</i> (10)	2,75 – 4,20	1,32 – 1,84	4,91 – 6,27
<i>B. bufo</i> (10)	4,04 – 4,70	2,15 – 2,64	5,61 – 6,44

Linearnom regresijom su detaljnije ispitani odnosi onih varijabli za koje je Kanonijskom diskriminantnom analizom (CDA) utvrđeno da najviše doprinose taksonomskom razlikovanju analiziranih vrsta (HLV, HWV i TL). Pošto su vrednosti koeficijenta determinacije ( $r^2$ ) bili niski ( $< 0,3$ ), samo je odnos TL/HWV prikazan na grafiku (Slika 23).



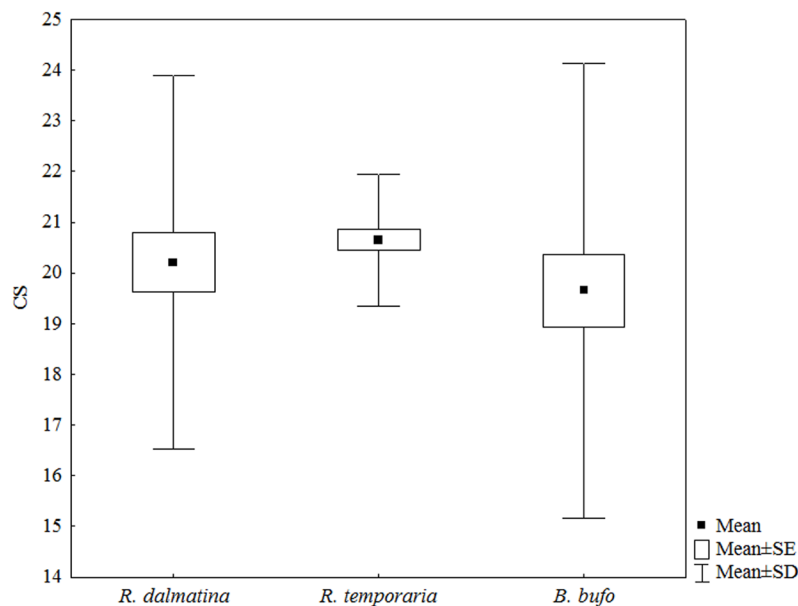
**Slika 23.** Regresiona analiza standardizovanih varijabli širine glave (HWV) na vrednosti dužine repa (TL).

Uočena je pozitivna korelacija za vrstu *R. dalmatina*, nasuprot negativne korelacije koja se javlja za vrste *R. temporaria* i *B. bufo*. Najbolja aproksimacija linearnom regresijom je zabeležena kod *R. dalmatina* ( $r^2 = 0,25$ ), dok je najslabija utvrđena kod *R. temporaria* (koeficijent determinacije je 0,01).

## 4.2.2. Geometrijska vs. tradicionalna morfometrijska analiza varijabilnosti veličine i oblika tela punoglavaca

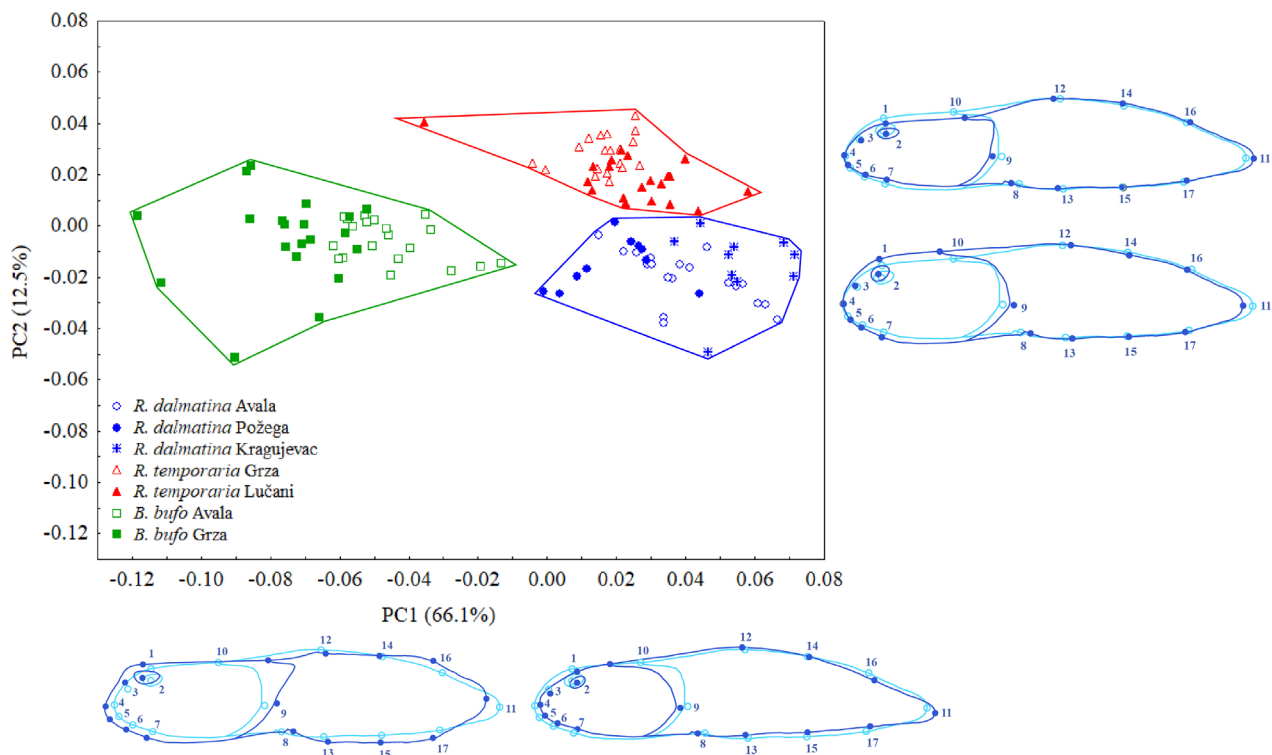
### 4.2.2.1. Rezultati dobijeni primenom geometrijske morfometrije

Analizom varijanse (ANOVA) nije utvrđena statistički značajna razlika u veličini punoglavaca među analiziranim vrstama ( $F_{2,117} = 0,84, P = 0,4324$ ). Srednja vrednost (Mean), standardne devijacije (SD) i standardne greške (SE) veličine centroida (CS) za svaku vrstu su prikazane na Slici 24.



**Slika 24.** Grafički prikaz srednje vrednosti (Mean), standardne devijacije (SD) i standardne greške (SE) veličine centroida (CS) analiziranih vrsta.

Primenom Analize glavnih komponenti (PCA) (Slika 25), uočava se jasno razdvajanje *B. bufo* od dve vrste roda *Rana* duž PC1 ose koja opisuje 66,1% ukupne varijabilnosti oblika. Za razliku od punoglavaca *R. dalmatina* i *R. temporaria*, punoglavci *B. bufo* su generalno robustniji i odlikuju se većim telima sa posteriorno postavljenim dorzalnim perajima, a repovi su im kraći, sa perajima širim u posteriornom delu i širim vrhovima repova. Kod punoglavaca vrste *B. bufo* telo i rep imaju približno istu dužinu, dok je kod obe vrste roda *Rana* rep gotovo dva puta duži od glave. Duž PC2 ose (koja opisuje 12,5% ukupne varijabilnosti oblika) razdvojili su se punoglavci *R. temporaria* (pozicionirani u pozitivnom delu PC2 ose) od punoglavaca *R. dalmatina* (u negativnom delu PC2 ose). U poređenju sa *R. dalmatina*, *R. temporaria* punoglavci imaju duže repove sa zašiljenijim vrhom i manjom glavom na kojoj je dorzalna insercija repnog peraja postavljena niže. Dodatno, PCA analiza je pokazala da se različite populacije iste vrste grupišu zajedno (Slika 25).



**Slika 25.** Analiza glavnih komponenti (PCA) varijabli oblika (Prokrustovih koordinata). Promene oblika duž prve (PC1) i druge (PC2) ose su prikazane u vidu deformacionih konturnih dijagrama. Jedinke iste vrste su oivičene poligonima, a različite populacije iste vrste su obeležene odgovarajućim simbolima.

Multivarijantna analiza kovarijanse (MANCOVA) rađena na prvih pet PC osa koje opisuju 91,5% ukupne varijabilnosti oblika utvrdila je statistički značajne razlike u obliku između punoglavaca analiziranih vrsta ( $\lambda_{Wilks} = 0,7314$ ,  $F_{10,220} = 3,72$ ,  $P = 0,0001$ ). Takođe, značajan uticaj veličine na varijabilnost oblika ukazuje na prisustvo alometrije ( $\lambda_{Wilks} = 0,6878$ ,  $F_{5,110} = 9,99$ ,  $P = 0,0000$ ), dok značajna interakcija veličine i vrste ukazuje da različite vrste imaju različite alometrijske nagibe ( $\lambda_{Wilks} = 0,7771$ ,  $F_{10,220} = 2,96$ ,  $P = 0,0017$ ).

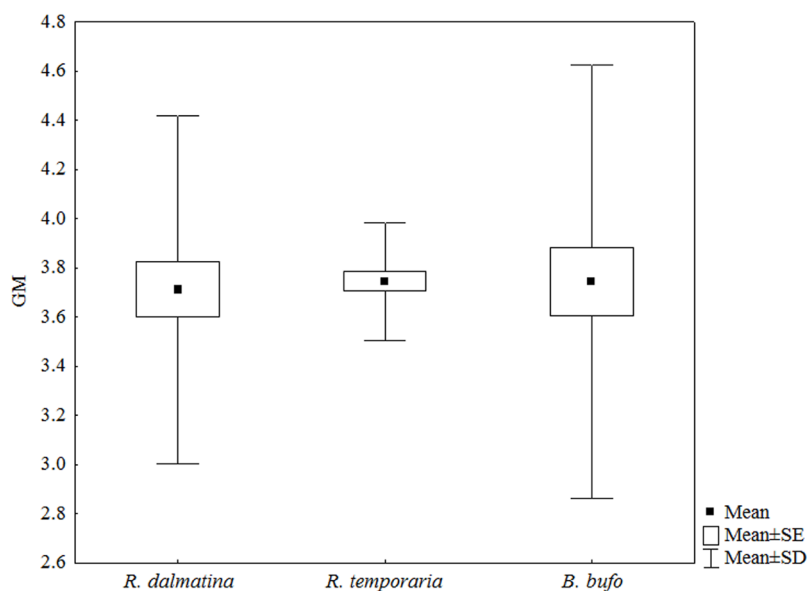
Interspecijske razlike u obliku punoglavaca su kvantifikovane Mahalanobisovim distancama (Md). Najmanja razlika u obliku punoglavaca je utvrđena između *R. dalmatina* i *R. temporaria* (Md = 10,5805,  $P < 0,0001$ ), nešto veća između *B. bufo* i *R. dalmatina* (Md = 14,1408,  $P < 0,0001$ ), dok je najveća razlika u obliku punoglavaca između *B. bufo* i *R. temporaria* (Md = 15,8947,  $P < 0,0001$ ). Na osnovu *leave-one-out* kros-validacione DFA, 100% analiziranih punoglavaca je korektno reklasifikovano u odgovarajuću vrstu.



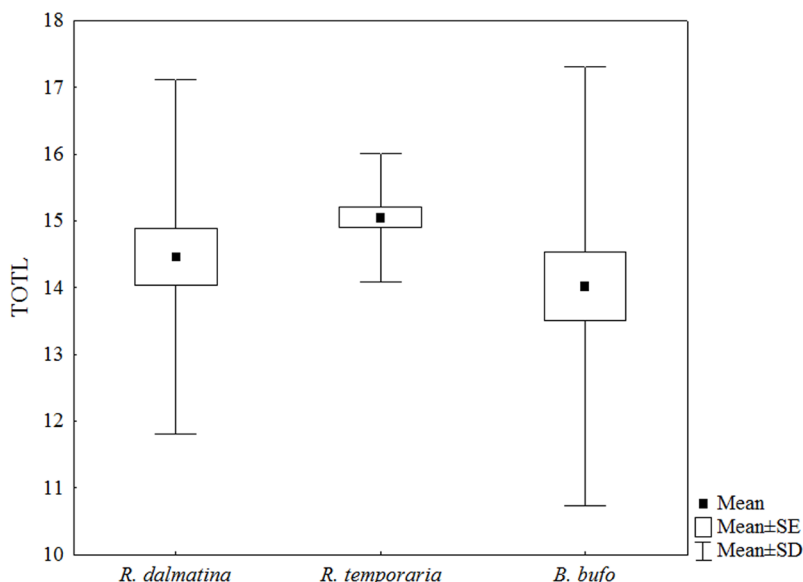
#### 4.2.2.2. Rezultati dobijeni primenom tradicionalne morfometrije

Analizom varijanse (ANOVA) nije utvrđena statistički značajna razlika u ukupnoj veličini/ ukupnoj dužini punoglavaca analiziranih vrsta, odnosno analizirani punoglavci se nisu razlikovali kako u geometrijskoj sredini (GM) ( $F_{2,117} = 0,03$ ,  $P = 0,9678$ ), tako ni u ukupnoj dužini tela (TOTL) ( $F_{2,117} = 1,70$ ,  $P = 0,1865$ ). Srednja vrednost (Mean), standardna devijacija (SD) i standardna greška (SE) geometrijske sredine (GM) i ukupne dužine punoglavca (TOTL) su grafički prikazane za svaku vrstu na Slici 26.

a)



b)



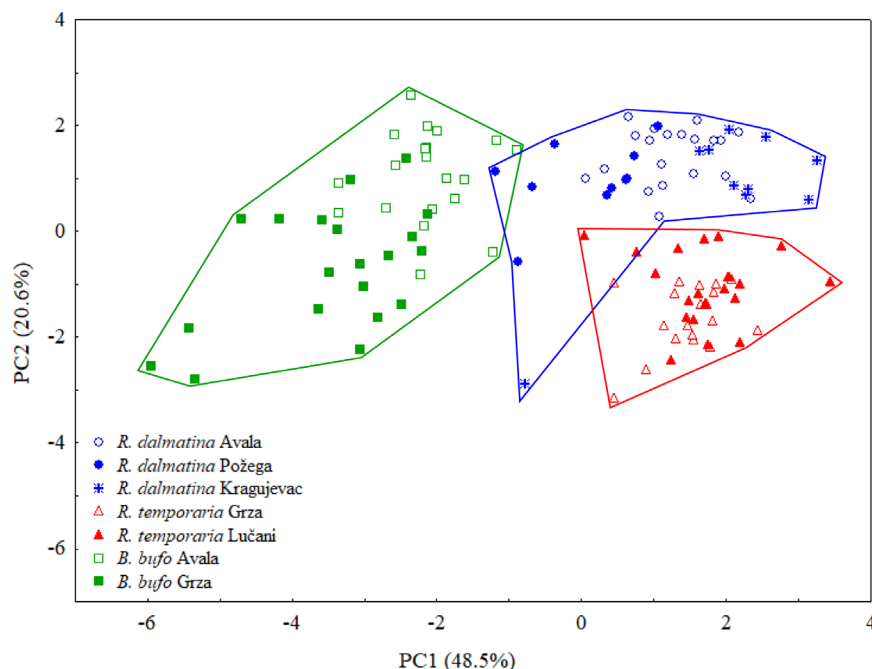
**Slika 26.** Grafički prikaz srednje vrednosti (Mean), standardne devijacije (SD) i standardne greške (SE) a) geometrijske sredine (GM) i b) ukupne dužine punoglavaca (TOTL) analiziranih vrsta.

Rezultati jednofaktorske ANOVA za svaku od 10 GM-standardizovanih varijabli prikazani su u Tabeli 9. Sve varijable su pokazale statistički značajne razlike među analiziranim vrstama ( $P < 0,001$ ).

**Tabela 9.** Analiza varijanse (ANOVA) za svaku od 10 GM-standardizovanih linearnih mera sa vrstom kao kategoričkim faktorom. HH – visina glave, HL – dužina glave, E – prečnik oka, TH – visina repa, TL – dužina repa, CC – visina repnog/centralnog mišića, VT – distanca od analnog otvora do vrha repa, DIT – distanca između dorzalne insercije repnog peraja do vrha repa, DIS – distanca između dorzalne insercije repnog peraja i vrha njuške, VS – distanca između analnog otvora i vrha njuške. *df1*, *df2* – stepeni slobode; *F* – *F* vrednost; *P* – statistička značajnost posle Bonferoni korekcije.

	<i>df1</i> , <i>df2</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<b>HH</b>	2, 117	113,92	<0,0001
<b>HL</b>	2, 117	46,76	<0,0001
<b>E</b>	2, 117	20,86	<0,0001
<b>TH</b>	2, 117	10,36	<0,001
<b>TL</b>	2, 117	190,60	<0,0001
<b>CC</b>	2, 117	32,06	<0,0001
<b>VT</b>	2, 117	178,14	<0,0001
<b>DIT</b>	2, 117	196,37	<0,0001
<b>DIS</b>	2, 117	175,57	<0,0001
<b>VS</b>	2, 117	21,14	<0,0001

Na grafiku analize glavnih komponenti (PCA) (Slika 27) utvrđeno je razdvajanje analiziranih vrsta. Duž PC1 ose (opisuje 48,5% varijabilnosti) razdvojili su se punoglavci dve vrste roda *Rana* od punoglavaca *B. bufo*, dok su se punoglavci dve vrste mrkih žaba razlikovali duž PC2 ose (opisuje 20,6% varijabilnosti).



**Slika 27.** Analiza glavnih komponenti (PCA) ln-transformisanih GM-standardizovanih linearnih mera. Jedinke iste vrste su oivičene poligonima, a različite populacije iste vrste su obeležene odgovarajućim simbolima. Videti Tabelu 10 sa opterećenjima faktora dobijenih u ovoj PCA analizi.

Takođe, Analizom glavnih komponenti (PCA) je utvrđeno da su duž PC1 ose najdiskriminativniji karakteri među vrstama bili oni koji su se ticali dužine repa (TL, VT, DIT) i dužine glave (DIS, HL), dok su prečnik oka (E) i linearne mere koje su u vezi sa širinom repnog mišića (CC) doprinele razdvajanju vrsta duž PC2 ose (Tabela 10).

**Tabela 10.** Opterećenja faktora dobijenih Analizom glavnih komponenti (PCA) ln-transformisanih GM-standardizovanih linearnih mera. Obeležena (**bold**) su opterećenja veća od 0,8.

	PC1	PC2
HH	-0,6204	0,4935
HL	<b>-0,8202</b>	-0,1359
E	0,2077	<b>0,8269</b>
TH	0,2921	-0,4330
TL	<b>0,9315</b>	-0,2005
CC	-0,1061	<b>-0,8412</b>
VT	<b>0,9188</b>	-0,2212
DIT	<b>0,9178</b>	0,0915
DIS	<b>-0,8236</b>	-0,2748
VS	-0,6464	-0,2165

Srednje vrednosti i standardne devijacije 10 GM-standardizovanih linearnih varijabli date su u Tabeli 11. U poređenju sa dve vrste roda *Rana*, *B. bufo* punoglavci (negativni deo PC1 ose) se odlikuju manjim srednjim vrednostima repa (TL, VT, DIT), ali većim srednjim vrednostima dužine glave (DIS, HL). Punoglavci *R. dalmatina* (pozitivni deo PC2 ose) pokazali su veću srednju vrednost za prečnik oka (E) u odnosu na punoglavce *R. temporaria* (negativni deo PC2 ose) koji su imali i širi centralni repni mišić (CC).

Na kraju, PCA je pokazala da se populacije iste vrste grupišu zajedno (Slika 27).

**Tabela 11.** Srednje vrednosti (Mean) i standardne devijacije (SD) za 10 GM-standardizovanih linearnih varijabli.

	<i>R. dalmatina</i>		<i>R. temporaria</i>		<i>B. bufo</i>	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
HH	0,825	0,068	0,688	0,036	0,878	0,065
HL	1,498	0,049	1,475	0,035	1,589	0,076
E	0,124	0,012	0,107	0,010	0,112	0,015
TH	0,892	0,042	0,909	0,046	0,863	0,048
TL	2,423	0,124	2,561	0,064	2,162	0,081
CC	0,275	0,015	0,302	0,012	0,290	0,019
VT	2,293	0,111	2,414	0,078	2,028	0,088
DIT	3,091	0,187	2,980	0,115	2,466	0,140
DIS	0,931	0,101	1,085	0,092	1,356	0,114
VS	1,696	0,059	1,704	0,035	1,781	0,087

Dve multivarijantne analize kovarijanse (MANCOVA) izvršene na prvih pet PC osa (koje opisuju 94,2% ukupne varijabilnosti), sa ln GM i ln TOTL kao kovarijablama su pokazale slične

rezultate: statistički značajne razlike u obliku između punoglavaca analiziranih vrsta (MANCOVA sa ln GM kao kovarijablom:  $\lambda_{Wilks} = 0,6374$ ,  $F_{10,220} = 5,56$ ,  $P = 0,0000$ ; MANCOVA sa ln TOTL kao kovarijablom:  $\lambda_{Wilks} = 0,2625$ ,  $F_{10,220} = 20,94$ ,  $P = 0,0000$ ), statistički značajan efekat veličine koji ukazuje na prisustvo alometrije (MANCOVA sa ln GM kao kovarijablom:  $\lambda_{Wilks} = 0,8585$ ,  $F_{5,110} = 3,63$ ,  $P = 0,0045$ ; MANCOVA sa ln TOTL kao kovarijablom:  $\lambda_{Wilks} = 0,8581$ ,  $F_{5,110} = 3,64$ ,  $P = 0,0044$ ), kao i statistički značajnu interakciju između veličine i analiziranih vrsta, tj. heterogenost nagiba alometrijskih prava među vrstama (MANCOVA sa ln GM kao kovarijablom:  $\lambda_{Wilks} = 0,8059$ ,  $F_{10,220} = 2,51$ ,  $P = 0,0072$ ; MANCOVA sa ln TOTL kao kovarijablom:  $\lambda_{Wilks} = 0,7870$ ,  $F_{10,220} = 2,80$ ,  $P = 0,0028$ ).

Interspecijske razlike kod punoglavaca kvantifikovane su kvadratnim Mahalanobisovim distancama (Md). Očekivano, interspecijska razlika je bila najmanja između punoglavaca *R. dalmatina* i *R. temporaria* (Md = 24,2712,  $F_{9,109} = 50,25$ ,  $P < 0,001$ ), nešto veća između punoglavaca *B. bufo* i *R. dalmatina* (Md = 25,1628,  $F_{9,109} = 52,09$ ,  $P < 0,001$ ), dok je najveća vrednost interspecijske razlike dobijena između punoglavaca *B. bufo* i *R. temporaria* (Md = 51,3068,  $F_{9,109} = 106,22$ ,  $P < 0,001$ ). Kros-validaciona DFA je pokazala da se 99,2% analiziranih punoglavaca korektno reklasifikuje u odgovarajuću vrstu.

## **5. DISKUSIJA**

### 5.1. Taksonomska genetička identifikacija i genetička varijabilnost mrkih žaba (*Rana* sp. i obične krastače (*B. bufo*) na području Srbije

Jedna od primena DNK barkoding metode kod vodozemaca je i identifikacija larvenih stupnjeva. U ovoj studiji, genetička taksonomska identifikacija bila je neophodna procedura u procesu procene nivoa morfološke diferencijacije i korektna taksonomske identifikacije na osnovu spoljašnjih morfoloških karakteristika punoglavaca vrsta mrkih žaba (rod *Rana*) i obične krastače (*B. bufo*) na teritoriji Srbije.

Taksonomska identifikacija vrsta analiziranih uzoraka punoglavaca u ovom istraživanju izvršena je DNK barkoding metodom, primenom 16S *rRNA* markera koji se preporučuje kada su u pitanju vodozemci (Vences i sar., 2002; 2005a, b; Vejarano i sar., 2006; Priti i sar., 2015). Dobijene sekvence su upotrebljene za konstrukciju filogenetskog stabla (Slika 17).

Dobijeni rezultati filogenetske analize uzoraka tri vrste roda *Rana* (*R. dalmatina*, *R. graeca* i *R. temporaria*) sa teritorije Srbije u skladu su sa prethodnim filogenetskim istraživanjima ove tri vrste (Seppä i Laurila, 1999; Picariello i sar., 2002; Veith i sar., 2002, 2003; Sumida i sar., 2003; Hillis i Wilcox, 2005; Bossuyt i sar., 2006; Feliciello i sar., 2006; Teacher i sar., 2009; Vences i sar., 2013, 2017; Canestrelli i sar., 2014; Yuan i sar., 2016).

Vrsta *R. dalmatina* pokazala je nisku filogenetsku struktuiranost što je karakteristično za vrste mrkih žaba koje su tokom glacijacije bile ograničene na male areale i specijalizovale se u određenim staništima na jugu Evrope. Pretpostavlja se da je *R. dalmatina* tokom čitavog Pleistocena opstajala unutar jednog ili dva refugijuma u Mediteranskoj oblasti, odakle se kasnije širila prilično brzo ka centralnoj Evropi (Vences i sar., 2013). Ova vrsta ima nizak nivo genetičke varijabilnosti u okviru celog svog areala, osim populacija u Italiji koje su identifikovane kao genetički najdivergentnije (Vences i sar., 2013). Takođe, Italija se smatra centrom genetičkog diverziteta vrste *R. dalmatina* (Vences i sar., 2013; Canestrelli i sar., 2014). Sekvence *R. dalmatina* sa teritorije Srbije analizirane u ovom istraživanju su takođe uniformne i u velikoj meri identične.

Iako morfološka varijabilnost punoglavaca *R. graeca* nije mogla biti analizirana u ovoj studiji (videti Procedure gajenja punoglavaca u laboratorijskim uslovima, poglavlje Materijal i Metode), jedinke grčke žabe sa teritorije Srbije su bile uključene u DNK barkoding analizu. Analizirane sekvence su poravnate i poređene sa sekvencama dostupnim u *GenBank* bazi (pristupni brojevi AY147942 i KX269199), sa kojima su pokazale veliku sličnost.

Vrstu *R. temporaria* karakteriše visoka genetička varijabilnost (Vences i sar., 2013) i prema Veith i sar. (2003) ova vrsta pripada posebnoj kladi mrkih žaba koja se naziva „*temporaria* grupa”. U ovom istraživanju, sekvence uzoraka iz Zapadne Srbije (Lučani) grupisale su se na filogenetskom stablu bliže sekvencama poreklom iz Italije, Hrvatske, Nemačke i Francuske, dok su se uzorci sakupljeni u Istočnoj Srbiji (Bigar, Đerdap, Grza) grupisali bliže uzorcima iz Rumunije, Švedske, Ukrajine i Češke. Utvrđeno je da se u odnosu na ostale, sekvence uzoraka sa lokaliteta Lučani razlikuju u četiri, a sa Vlasine u tri bazna para. Detaljnijom analizom sekvenci u odgovarajućim programima, kao i računanjem genetičkih distanci, uočena je heterogenost analiziranih sekvenci, što

je u skladu sa dosadašnjim istraživanjima genetičke varijabilnosti ove vrste mrke žabe na području Evrope (Reh i Seitz, 1990; Veith i sar., 2003; Vences i sar., 2013). Smatra se da je za vreme glacijacije *R. temporaria* naseljavala refugijume na području južne Evrope, odnosno Iberijsko, Italijansko i Balkansko poluostrvo (Taberlet i sar., 1998; Teacher i sar., 2009; Stefani i sar., 2012), ali se nalazila i u mnogim refugijumima u centralnoj i severnoj Evropi odakle je kasnije rekolonizovala Evropu (Veith i sar., 2003). Pored toga što je jedna od najšire rasprostranjenih vrsta, *R. temporaria* naseljava i veoma različite tipove staništa i dobro se adaptira na različite sredinske uslove, što može biti uzrok njene visoke intra- i interspecijske genetičke varijabilnosti (Vences i sar., 2013, 2017).

U *B. bufo* kladi uzorci iz Srbije su pozicionirani bliže uzorcima iz Grčke i Turske, mada je cela klada kompaktna, a izračunata intraspecijska genetička distanca niske vrednosti. Iako su razlike jasne (potvrđene sekvenciranjem koje je vršeno u oba smera), varijabilnost sekvence je zabeležena samo u uzorcima sa lokaliteta Trešnjica i onima sa lokaliteta Grza. Koristeći mikrosatelite, Brede i Beebee (2006) su utvrdili prilično nizak nivo genetičke varijabilnosti populacija *B. bufo* u čitavoj Evropi. Smatra se da je jedno od glavnih refugijuma ove vrste bilo Balkansko poluostrvo odakle se vršila rekolonizacija (Recuero i sar., 2012). Isti autori su utvrdili da postoji kontrast između visokog nivoa genetičke varijabilnosti u južnim populacijama *B. bufo* (Apeninsko i Balkansko poluostrvo) i genetičke homogenosti populacija na severu Evrope (Recuero i sar., 2012).

## **5.2. Pregled spoljašnjih morfoloških karaktera ranih larvenih stadijuma mrkih žaba (rod *Rana*) i *B. bufo* sa teritorije Srbije koji najviše doprinose njihovoj taksonomskoj identifikaciji**

U ovoj studiji je vršena analiza morfološke varijabilnosti punoglavaca tri vrste bezrepih vodozemaca kombinovanjem metoda tradicionalne i geometrijske morfometrije. Analiza punoglavaca vrsta *R. dalmatina*, *R. temporaria* i *B. bufo*, sakupljenih iz prirode na ranim razvojnim stupnjevima (23. do 25. prema Gosneru, 1960) i analiziranih metodama tradicionalne morfometrije, utvrdila je da su najinformativnije linearne mere za njihovo razlikovanje: širina glave (HWV), dužina glave (HLV) i dužina repa (TL). Relativna veličina glave predstavlja karakter za razlikovanje rodova *Rana* i *Bufo*, dok je relativna dužina repa karakter za razlikovanje dve vrste mrkih žaba.

Primenom metoda geometrijske i tradicionalne morfometrije analizirana je varijabilnost u veličini i obliku laboratorijski gajenih punoglavaca *R. dalmatina*, *R. temporaria* i *B. bufo* na ranim stupnjevima razvića (25. do 29. prema Gosneru, 1960). Oba pristupa su dala veoma slične rezultate kada su u pitanju kvantifikacija i opis varijabilnosti veličine i oblika, pri čemu je samo metodom geometrijske morfometrije detektovana razlika u obliku distalnog regiona repa. Za meru ukupne veličine punoglavca korišćene su veličina centroida (CS), geometrijska sredina (GM) i ukupna dužina (TOTL), i ni u jednom slučaju nije detektovana statistički značajna razlika u veličini između analiziranih vrsta. Međutim, multivarijantne analize su utvrdile statistički značajne razlike u obliku punoglavaca i statistički značajan efekat alometrije kao mogućeg uzroka uočene varijabilnosti oblika.

Primenom oba morfometrijska pristupa moguće je oblik analiziranih punoglavaca opisati na sličan način (Slike 25 i 27; Tabele 9, 10 i 11). Za razliku od punoglavaca *B. bufo*, punoglavci dve vrste roda *Rana* su generalno sitniji, sa manjim telima i repovima okvirno dva puta dužim od tela. Poređenjem dve vrste mrkih žaba utvrđeno je da *R. dalmatina* punoglavci imaju kraći rep i veće telo. Međutim, veoma male, suptilne razlike u obliku distalnog dela repa bilo je moguće detektovati samo primenom geometrijske morfometrije. Naime, na Slici 25. se može uočiti da punoglavci vrste roda *Rana* u odnosu na punoglavce *B. bufo* imaju uže posteriorne delove repnih peraja i uže vrhove repova, dok su kod punoglavaca *R. dalmatina* vrhovi repova više zaobljeni u odnosu na punoglavce *R. temporaria*. Slično studiji Priestley i sar. (2010) koji su pokazali da je za razlikovanje i taksonomsku identifikaciju dve simpatričke vrste punoglavaca (*Rana okaloosae* i *R. clamitans clamitans*) na ranom razvojnom stupnju (u laboratoriji i na terenu), pored kvalitativnih karakteristika i broja redova

zubića, veoma bitna i analiza oblika repa punoglavaca, i rezultati proistekli iz ove studije ukazuju na značaj analize oblika repa punoglavaca na ranim stupnjevima razvića za razlikovanje vrsta koje dele isto stanište.

Identifikovanje različitih vrsta žaba na larvenom stupnju predstavlja prednost na terenu jer omogućava monitoring ove grupe vodozemaca u sezoni kada su adulti slabije aktivni, kao što je period van sezone parenja (Priestley i sar., 2010). Identifikovanje punoglavaca na osnovu usnog aparata se često koristi u taksonomiji. Međutim, ova tehnika zahteva korišćenje mikroskopa pri čemu analizirane jedinke moraju biti ili žrtvovane ili anestezirane. Za potrebe identifikacije živih punoglavaca na terenu neophodno je poznavanje morfoloških karakteristika, tj. odnosa visine i dužine repa, distance između vrha njuške i analnog otvora i ukupne dužine jedinke (Priestley i sar., 2010).

Brojna istraživanja vrsta bezrepih vodozemaca ukazuju na kompleksnu interakciju filogenije, morfologije, staništa, stope rasta i brzine plivanja (Richardson, 2001, 2002; Arendt, 2003, 2010; Dayton i sar., 2005), kao i na slab filogenetski signal i ekstremnu plastičnost kod punoglavaca (Eterovick i sar., 2010; Sherratt i sar., 2017). Morfološka varijabilnost punoglavaca se uočava kako na individualnom tako i na populacionom i specijskom nivou (Altig i Johnston, 1989; Duellman i Trueb, 1994; Johansson i Richter-Boix, 2013; Sherratt i sar., 2017). Punoglavci različitih vrsta koji naseljavaju određene ekološke niše imaju karakteristične, potencijalno konvergentne forme, prema kojima se svrstavaju u odgovarajuće ekomorfološke grupacije (Orton, 1953; Altig i Johnston, 1989; McDiarmid i Altig, 1999; Sherratt i sar., 2018). Sa druge strane, srodne vrste žaba se smenjuju duž sredinskog gradijenta i donekle preklapaju, pa je neophodno izučavanje njihovih fenotipskih razlika, evolucije, kao i adaptivnih karakteristika koje im omogućavaju opstanak u datim staništima (Van Buskirk, 2009).

### **5.3. Efikasnost primene metoda tradicionalne i geometrijske morfometrije u morfološkoj diferencijaciji ranih larvenih stadijuma kod sintopnih populacija mrkih žaba (rod *Rana*) i *B. bufo* na teritoriji Srbije**

Primenom diskriminantne funkcijske analize (DFA) ustanovljeni su gotovo identični i izuzetno visoki procenti korektne klasifikacije od 100% za geometrijsku i 99,2% za tradicionalnu morfometriju. Slično, Escoriza i Ben Hassine (2014) su u svojoj geometrijsko-morfometrijskoj studiji punoglavaca dve vrste žaba roda *Pelobates*, ali zasnovanoj na upotrebi kontura, registrovali veoma visoku diskriminacionu moć primenjene metodologije (96% korektno klasifikovanih punoglavaca). Superiornost geometrijske nad tradicionalnom morfometrijom ističe Arendt (2010). Poredeći ova dva pristupa u pogledu efikasnosti razlikovanja pet vrsta punoglavaca (porodica Scaphiropodidae), Arendt (2010) je utvrdio da se 98% uzoraka korektno klasifikovalo primenom geometrijske, a svega 70% primenom tradicionalne morfometrije. Približno iste vrednosti klasifikacione tačnosti koje su u ovoj studiji dobijene korišćenjem metoda geometrijske i tradicionalne morfometrije mogu biti posledica procedura primenjenih prilikom sakupljanja linearnih podataka u okviru tradicionalno-morfometrijskog pristupa. Naime, za razliku od ovog istraživanja u kojoj su linearne mere generisane sa fotografija, Arendt (2010) je linearne mere prikupio korišćenjem šublera.

U svom revijalnom radu o upotrebi geometrijske morfometrije u herpetologiji, Kaliontzopoulou (2011) navodi da su autori koji su poredili geometrijsku i tradicionalnu morfometriju zaključili da je geometrijska morfometrija osetljivija u detektovanju i opisivanju varijabilnosti oblika (Valenzuela i sar., 2004; Bonnan i sar., 2008; Kaliontzopoulou i sar., 2008; Arendt, 2010). Kao što je već istaknuto, metode tradicionalne i geometrijske morfometrije primenjene u ovoj studiji daju veoma slične rezultate, a glavna razlika između geometrijske i tradicionalne morfometrije ogleda se u opisu i efikasnosti detekcije varijabilnosti oblika distalnog regiona repa analiziranih punoglavaca. Navedena razlika je verovatno posledica činjenice da standardnom setu linearnih mera (tradicionalno-morfometrijski pristup) nedostaju mere uzete u distalnom delu repa, dok je standardni set specifičnih



tačaka (geometrijsko-morfometrijski pristup) obuhvatio i tačke u ovom regionu. Opisane diskretne razlike u obliku distalnog regiona repa nisu mogle biti detektovane metodama linearne morfometrije jer se one zasnivaju na merenju samo maksimalne dužine i visine repa (Relyea, 2001; Grosjean, 2005; Alvarez i Nicieza, 2006; Altig, 2007; Arendt, 2010; Hsu i sar., 2011; Lima i Pederassi, 2012; Ilić i sar., 2016). Pošto geometrijsku morfometriju odlikuje potencijal da zabeleži suptilne varijacije u obliku morfoloških struktura, ona može biti upotrebljena kao komplementarna metoda drugim merama koje se obično koriste u tradicionalnoj morfometriji (Arendt, 2010; Escoriza i Ben Hassine, 2014). Za brzinu plivanja, a samim tim i strategiju odbrane od predatora, najvažnija je visina repa i repnog mišića u srednjem i/ili posteriornom delu (Johnson i sar., 2008; Arendt 2010). Analiziranjem odnosa morfologije i brzine plivanja punoglavaca pet vrsta žaba (Scaphiropodidae), Arendt (2010) je uočio da brži plivači imaju viši rep (pogotovu u posteriornom delu) i zaključio da ova karakteristika ne bi mogla biti zabeležena primenom tradicionalne morfometrije koja obično meri samo maksimalnu širinu repa.

Razlike u metodama (uključujući odabir linearnih mera i specifičnih tačaka) mogu da dovedu do neslaganja u rezultatima. Međutim, direktnim poređenjem studija koje koriste metode tradicionalne i geometrijske morfometrije (uključujući one koje se bave morfološkom varijabilnošću punoglavaca) je moguće uočiti podudarnost rezultata ukoliko šema linearnih mera odgovara šemi specifičnih tačaka, tj. kada se koristi adekvatan broj i raspored linearnih mera. Ovakvo podudaranje je dobio Larson (2002) koji je korišćenjem oba morfometrijska pristupa (linearnog i geometrijskog) analizirao rast hondrokranijuma kod punoglavaca *R. sylvatica* i pokazao da se rezultati tradicionalno- i geometrijsko-morfometrijske analize u velikoj meri podudaraju, tj. da rast hondrokranijuma nije izometrijski i da su kod ovih punoglavaca prisutni regionalno razdvojeni obrasci promena oblika.

Takođe, važno je napomenuti da se u ovoj studiji prednost geometrijske morfometrije (kao i prednost tradicionalne morfometrije u kojoj se linearne mere generišu sa fotografijom) u odnosu na pristup tradicionalne morfometrije kada se linearne mere prikupljaju korišćenjem šublera ogleda i u sledećem. Naime, analizirani punoglavci tri vrste (*R. dalmatina*, *R. temporaria* i *B. bufo*) su prilično mali, prosečna vrednost ukupne dužine punoglavaca (TOTL) je iznosila od 14 do 15 mm (Slika 26b; Prilog Tabela 4). Obzirom na mekanu konstituciju tela, punoglavci su veoma nezgodni za rukovanje, te bi uzimanje linearnih mera šublerom bilo neprecizno, a moglo bi dovesti i do značajnog oštećenja jedinki.

Izučavanje oblika različitih larvenih stupnjeva koji pripadaju istoj vrsti može da bude od pomoći u rešavanju taksonomskih i filogenetskih problema gde karakteristike adulta nisu dovoljne (Grosjean, 2005). Obrasci promena oblika koji se detektuju primenom metoda geometrijske morfometrije kod punoglavaca takođe mogu biti kvantifikovani, vizualizovani i poređeni u studijama koje se bave statičkom, ontogenetskom ili evolucionom alometrijom, adaptacijama i fenotipskom plastičnošću, kao i u svetlu sistematike, taksonomije i filogenije bezrepih vodozemaca (Kaliontzopoulou, 2011).

#### **5.4. Varijabilnost oblika punoglavaca: uticaj filogenetskih ograničenja i sredinskih faktora**

Morfološke karakteristike punoglavaca imaju važnu ulogu u rekonstrukciji filogenije i evolucione istorije glavnih klada žaba (Haas, 2003). Rani razvojni stupnjevi punoglavaca nisu često bili predmet taksonomskih studija, jer se smatra da nemaju dovoljno spoljašnjih morfoloških karakteristika na osnovu kojih bi se zabeležile promene, odnosno razlike između analiziranih vrsta. U ovoj studiji je poređenjem morfoloških i genetičkih interspecijskih distanci utvrđeno da se varijabilnost oblika upravo ovih uzrasnih stupnjeva *R. dalmatina*, *R. temporaria* i *B. bufo* poklapa sa dobijenim genetičkim odnosima između analiziranih vrsta, odnosno da je genetička osnova adaptacija vrsta i rodova glavni izvor njihove morfološke varijabilnosti.

Utvrđene taksonomske morfološke razlike ranih larvenih stadijuma *R. dalmatina*, *R. temporaria* i *B. bufo* se odnose na oblik glavenog i repnog regiona, kao i na relativnu dužinu repa. Morfološke razlike između punoglavaca vrsta roda *Rana* su manje, ali takođe uočljive, pri čemu je razlika u obliku zadnjeg dela repa između *R. dalmatina* i *R. temporaria* uočena samo primenom metoda geometrijske morfometrije. Važnost detaljne morfološke analize u tačnoj taksonomskoj identifikaciji su demonstrirali Kruger i sar. (2011) u svom istraživanju morfološki sličnih punoglavaca vrsta *Amietia vertebralis* i *A. umbraculata*, gde su jedinke često pogrešno identifikovane zbog nedovoljne analize karakteristika spoljašnje morfologije (Hewitt, 1927; Wager, 1965, 1986; Van Dijk, 1966; Lambiris, 1987, 1988, 1989; Channing, 2001; Tarrant i sar., 2008). Međutim, opširnijom morfometrijskom analizom koja je uključivala 33 linearne mere, utvrđene su morfološke karakteristike (oblik, dužina i obojenost repa, pozicija dozalnog peraja, broj zubića) za nedvosmisleno razlikovanje ove dve vrste, koje su Kruger i sar. (2011) potvrdili i molekularno-genetičkim metodama.

U ovoj studiji, analizom punoglavaca iz prirode (kao i onih gajenih u akvarijumu), pokazano je da punoglavci dve *Rana* vrste u odnosu na punoglavce *B. bufo* imaju manja tela i repove okvirno dva puta duže od tela. Opisani oblik tela punoglavaca *B. bufo* (veliko telo i mali rep) odgovara vrstama koje naseljavaju efemerna staništa, a tip morfologije se naziva kompetitor-orijentisana. Opisana morfologija punoglavaca roda *Rana* karakteristična je za vrste koje naseljavaju permanentna staništa i koje karakteriše bolja sposobnost plivanja (Relyea, 2002, 2004; Vences i sar., 2002; Relyea i Hoverman, 2003). Razvijeni rep može predstavljati prednost u većim vodenim telima gde jedinka preplivava duže distance, najverovatnije zbog termoregulacije ili potrage za hranom (Vences i sar., 2002). Povezanost morfologije punoglavaca i tipa staništa ispitivali su Dayton i sar. (2005) koji su utvrdili da „efemerna vrsta” *Scaphiopus holbrookii* ima relativno veće telo, dok vrsta koja naseljava permanentna staništa (*Rana sphenoccephala*) ima bolje razvijen rep, tj. ima širu osnovu repnog peraja i repni mišić. Kod laboratorijski gajenih punoglavaca *R. dalmatina*, Teplitsky i sar. (2005) su uočili pozitivnu korelaciju u odnosu brzine plivanja i visine i dužine repnog mišića. Punoglavci *R. temporaria* u manjim barama (u kojima je manje dostupne hrane i variranje nivoa vode je izraženije) imaju niže repno peraje i uža tela, za razliku od punoglavaca onih populacija koje naseljavaju veće bare, kod kojih je repno peraje više i omogućava brže plivanje (Piqué i sar., 2000; Vences i sar., 2002). Ova morfologija (malo telo i veliki rep) se naziva i antipredator-orijentisana, a karakteristična je za vrste koje naseljavaju staništa sa predatorima (Relyea i Werner, 2000; Van Buskirk, 2002). Šire repno peraje omogućava punoglavcima veću stopu preživljavanja, ne zbog veće brzine plivanja, već zbog toga što odvlači pažnju predatora od ranjivog tela punoglavca ka repnom peraju koje se regeneriše (Van Buskirk i sar., 2003). Smatra se da obnavljanje repova usled oštećenja od strane predatora nije „skupo” za jedinke, te predstavlja bitan mehanizam za preživljavanje (Vences i sar., 2002).

Razlikovanje vrsta se zasniva na poređenju varijabilnosti morfoloških karakteristika, fizioloških, razvojnih i ekoloških osobina, kao i odlikama ponašanja. U zadnje vreme se u ovu svrhu sve više koriste i molekularne metode (Padiál i sar., 2010). U svojoj studiji o kriptičnim vrstama kopepodnih račića, Karanović i sar. (2016) smatraju da se razvijanjem metoda za analizu morfološke varijabilnosti mogu dobiti iste, ako ne i detaljnije informacije o organizmima nego što je to moguće korišćenjem molekularno-genetičkih metoda. Na primer, metodama geometrijske morfometrije je moguće detektovati razlike između polova, što nije moguće korišćenjem DNK barkoding metode. Od načina na koji se analizira fenotip zavisi koliko će molekularne i morfološke karakteristike biti usklađene. Većina taksonoma analizira varijabilnost morfoloških karaktera koji su vidljivi, lako uočljivi, dok se fenotipske karakteristike koje se ne vide „golim okom” ređe razmatraju. Integrativna taksonomija (Dayrat, 2005), kao kombinovani pristup više metoda (npr. molekularnih i morfometrijskih), istraživanja čini temeljnijim, a rešavanje taksonomskih nedoumica adekvatnijim (Will i sar., 2005; Padiál i sar., 2010). Razdvajanje vrsta i njihov odgovarajući taksonomski opis je jedan od preduslova za unapređenje konzervacije vrsta (Mace, 2004; Goldstein i DeSalle, 2011; Platnick, 2013; Pante i sar., 2015).

## **6. ZAKLJUČCI**

Primenom 16S *rRNK* markera, izvršena je taksonomska identifikacija vrsta analiziranih uzoraka. Dobijeni rezultati filogenetske analize uzoraka tri vrste roda *Rana* (*R. dalmatina*, *R. graeca* i *R. temporaria*) i *B. bufo* sa teritorije Srbije su u skladu sa prethodnim filogenetskim istraživanjima. Najveća interspecijska genetička distanca je izračunata između *B. bufo* i *R. temporaria* sekvenci, zatim između *B. bufo* i *R. dalmatina*. Najmanja distanca je bila između *R. dalmatina* i *R. temporaria*. Srednja vrednost intraspecijske genetičke distance je bila najveća kod *R. temporaria*, zatim kod *B. bufo*, dok su kod *R. dalmatina* sekvence pokazale najmanju varijabilnost.

Tradicionalno morfometrijska analiza punoglavaca vrsta *R. dalmatina*, *R. temporaria* i *B. bufo*, sakupljenih iz prirode na ranim razvojnim stupnjevima (23. do 25. stupnja) utvrdila je da relativna veličina glave predstavlja karakter za razlikovanje rodova *Rana* i *Bufo*, dok je relativna dužina repa karakter za razlikovanje dve vrste mrkih žaba.

Analiza laboratorijski uspešno odgajenih punoglavaca *R. dalmatina*, *R. temporaria* i *B. bufo* na ranim stupnjevima razvića (25. do 29. stupnja), primenom metoda geometrijske i tradicionalne morfometrije, pokazala je da oba pristupa daju veoma slične rezultate kada su u pitanju kvantifikacija i opis varijabilnosti veličine i oblika.

Metodama geometrijske morfometrije je utvrđeno da su punoglavci *B. bufo* u odnosu na punoglavce *R. dalmatina* i *R. temporaria* generalno robustniji, sa većim telima i posteriorno postavljenim dorzalnim perajima, a da su im repovi kraći. Kod punoglavaca vrste *B. bufo* telo i rep imaju približno istu dužinu, dok je kod obe vrste roda *Rana* rep gotovo dva puta duži od glave. Kada su poređene dve vrste mrkih žaba, utvrđeno je da *R. dalmatina* punoglavci imaju kraći rep i veće telo.

Analizama tradicionalne morfometrije utvrđeno je da se, u poređenju sa dve vrste roda *Rana*, *B. bufo* punoglavci odlikuju većim srednjim vrednostima dužine glave (DIS, HL) i manjim srednjim vrednostima repa (TL, VT, DIT). Taksonomske razlike između punoglavca roda *Rana* ticala su se prečnika oka (E) i centralnog repnog mišića (CC).

Međutim, veoma male, suptilne razlike u obliku distalnog dela repa bilo je moguće detektovati samo primenom geometrijske morfometrije. Punoglavci analiziranih vrsta roda *Rana* u odnosu na punoglavce *B. bufo* imaju uže posteriorne delove repnih peraja i uže vrhove repova, dok su kod punoglavaca *R. dalmatina* vrhovi repova više zaobljeni u odnosu na punoglavce *R. temporaria*.

Diskriminaciona moć dva morfometrijska pristupa u razlikovanju punoglavaca na ranim razvojnim stupnjevima analiziranih vrsta žaba je gotovo identična i izuzetno visoka (procenat korektna klasifikacije od 100% za geometrijsku i 99,2% za tradicionalnu morfometriju).

Poređenjem morfoloških i genetičkih interspecijskih distanci utvrđeno je da se varijabilnost oblika punoglavaca *R. dalmatina*, *R. temporaria* i *B. bufo* poklapa sa dobijenim genetičkim odnosima između ovih vrsta.

Uočene morfološke razlike kod punoglavaca *R. dalmatina*, *R. temporaria* i *B. bufo* predstavljaju doprinos poznavanju morfologije ovih vrsta na ranim razvojnim stadijumima, što može imati primenu u određivanju njihove taksonomske pripadnosti, posebno u slučajevima sintopnih populacija, i unaprediti konzervaciju analiziranih vrsta.

## **7. LITERATURA**

- Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J. (2004): "Image Processing with ImageJ". *Biophotonics International*, 11: 36-42.
- Adams D.C., Rohlf F.J., Slice D.E. (2004): Geometric morphometrics: Ten years of progress following the „revolution“. *Italian Journal of Zoology*, 71: 5-16.
- Agasyan, A., Avisi, A., Tuniyev, B., Crnobrnja Isailovic, J., Lymberakis, P., Andrén, C., Cogalniceanu, D., Wilkinson, J., Ananjeva, N., Üzüm, N., Orlov, N., Podloucky, R., Tuniyev, S., Kaya, U. (2009): *Bufo bufo*. In: IUCN Red List of Threatened Species, [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
- Alcalde, L., Rosset, S.D. (2003): Descripción y comparación del condrocáneo en larvas de *Hyla raniceps* (Cope, 1862), *Scinax granulatus* (Peters, 1871) y *Scinax squalirostris* (A. Lutz, 1925) (Anura: Hylidae). *Cuadernos de Herpetología*, 17: 33-49.
- Altig, R. (1970): A key to the tadpoles of continental United States and Canada. *Herpetologica*, 26: 180-207.
- Altig, R. (1987): Key to the tadpoles of Mexico. *Southwestern Naturalist*, 32: 75-84.
- Altig, R. (2007): A primer for the morphology of anuran tadpoles. *Herpetological Conservation and Biology*, 2: 71-74.
- Altig, R., Brandon R.A. (1971): Generic key and synopsis for free-living larvae and tadpoles of Mexican amphibians. *Tulane studies in zoology and botany*, 17: 10-15.
- Altig, R., Johnston, G.F. (1986): Major characteristics of free-living anuran tadpoles. *Smithsonian Herpetological Information Service*, 67: 1-75.
- Altig, R., Johnston, G.F. (1989): Guilds of anuran larvae: relationships among developmental modes, morphologies, and habitats. *Herpetological Monographs*, 3: 81-109.
- Alvarez, D., Nicieza, G.A. (2006): Factors determining tadpole vulnerability to predators: can prior experience compensate for a suboptimal shape? *Evolutionary Ecology*, 20: 523-534.
- Ambrogio, A., Mezzadri, S. (2014): *Girini d'Italia-Tadpoles of Italy*. Gavia Edizioni, Piacenza, p. 102.
- Arendt, J.D. (2003): Reduced burst speed is a cost of rapid growth in anuran tadpoles: problems of autocorrelation and inferences about growth rates. *Functional Ecology*, 17: 328-334.
- Arendt, J. (2010): Morphological correlates of sprint swimming speed in five species of spadefoot toad tadpoles: comparison of morphometric methods. *Journal of Morphology*, 271: 1044-1052.
- Arnold, E.N. (2004): *Field Guide of Reptiles and Amphibians of Britain and Europe*, 2nd Edition. Collins, London, p. 173.
- Arnold, E.N., Oviden, D.W. (2002): *Reptiles and Amphibians of Europe*, Princeton University Press, New Jersey.
- Asimakopulos, B. (1997): *Rana graeca* Boulenger, 1891. – In: Gasc, J.P., Cabela, A., Crnobrnja-Isailović, J., Dolmen, D., Grossenbacher, K., Haffner, P., Lescure, J., Martens, H., Martínez Rica, J.P., Maurin, H., Oliveira, M.E., Sofianidou, T.S., Veith, M., Zuiderwijk, A. (eds): *Atlas of amphibians and reptiles in Europe*, Collection Patrimoines Naturels, Societas Europaea Herpetologica, Muséum National d'Histoire Naturelle & Service du Patrimoine Naturel, Paris, p. 496.
- Badyaev, A.V. (2005): Stress-induced variation in evolution: from behavioural plasticity to genetic assimilation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272: 877-886.
- Baldo, D., Candiotti, F.V., Haad, B., Kolenc, F., Borteiro, C., Pereyra, M.O., Pie, M.R. (2014): Comparative morphology of pond, stream and phytotelm-dwelling tadpoles of the South

- American Redbelly Toads (Anura: Bufonidae: Melanophryniscus). *Biological Journal of the Linnean Society*, 112: 417-441.
- Bonnan, M.F., Farlow, J.O., Masters, S.L. (2008): Using linear and geometric morphometrics to detect intraspecific variability and sexual dimorphism in femoral shape in *Alligator mississippiensis* and its implications for sexing fossil archosaurs. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 28: 422-431.
- Bookstein, F.L. (1991): *Morphometric Tools for Landmark Data*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, p. 435.
- Borkin, L.J., Veith, M. (1997): *Bufo bufo* Linnaeus, 1758, In: Gasc, J.P., Cabela, A., Crnobrnja-Isailović, J., Dolmen, D., Grossenbacher, K., Haffner, P., Lescure, J., Martens, H., Martínez Rica, J.P., Maurin, H., Oliveira, M.E., Sofianidou, T.S., Veith, M., Zuiderwijk, A. (eds): *Atlas of amphibians and reptiles in Europe*, Collection Patrimoines Naturels, Societas Europaea Herpetologica, Muséum National d'Histoire Naturelle & Service du Patrimoine Naturel, Paris, p. 496.
- Borzée, A., Park, S., Kim, A., Kim, H.T., Jang, Y. (2013): Morphometrics of two sympatric species of tree frogs in Korea: a morphological key for the critically endangered *Hyla suweonensis* in relation to *H. japonica*. *Animal Cells and Systems*, 17: 348-356.
- Bossuyt, F., Brown, R.M., Hillis, D.M., Cannatella, D.C., Milinkovitch, M.C. (2006): Phylogeny and biogeography of a cosmopolitan frog radiation: Late Cretaceous diversification resulted in continent-scale endemism in the family Ranidae. *Systematic Biology*, 55: 579-594.
- Boulenger, G.A. (1892): A synopsis of the tadpoles of the European batrachians. *Proceedings of the Zoological Society of London*, Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 59: 593-678, plates 45-47.
- Boulenger, G.A. (1897-1898): *The tailless batrachians of Europe*. Vols. 1 & 2, Ray Society, London.
- Box, G.E.P. (1949): A General Distribution Theory for a Class of Likelihood Criteria. *Biometrika*, 36: 317-346.
- Brede, E.G., Beebee, T.J.C. (2006): Consistently different levels of genetic variation across the European ranges of two anurans, *Bufo bufo* and *Rana temporaria*. *Herpetological Journal*, 16: 265-271.
- Canestrelli, D., Bisconti, R., Sacco, F., Nascetti, G. (2014): What triggers the rising of an intraspecific biodiversity hotspot? Hints from the agile frog. *Scientific Reports*, 4: 5042.
- Carroll, S.B. (2008): Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution. *Cell*, 134: 25-36.
- Channing, A. (2001): *Amphibians of Central and Southern Africa*. Cornell University, New York.
- Crnobrnja, J. (1982): Faunistic notes on amphibians and reptiles of Homolje. In: Homolje '81. Results of biological research. Young Researches of Serbia, Belgrade.
- Crnobrnja-Isailović, J., Paunović, M. (2015): Conservation and decline of European amphibians: The Republic of Serbia. – In: Heatwole, H., Wilkinson, J. (eds.) *Status of conservation and decline of amphibians: Eastern Hemisphere: Southeastern Europe and Turkey*. Pelagic Publishing, UK.
- Crnobrnja-Isailović, J., Milojković, D., Macura, B. (2015): *Vodozemci i gmizavci Đerdapa/ Amphibians and Reptiles of Đerdap*. Donji Milanovac, Serbia: JP Nacionalni Park Đerdap/ PE Đerdap National Park.
- Cvijanović, M., Ivanović, A., Kalezić, M., Zelditch, M. L. (2014): The ontogenetic origins of skull shape disparity in the *Triturus cristatus* group, *Evolution & Development*, 16: 306-317.

- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. (2012): jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9: 772.
- Dayrat B. (2005): Towards integrative taxonomy. *Biological journal of the Linnean society*, 85: 407-415.
- Dayton, G.H., Saenz, D., Baum, K.A., Langerhans, R.B., DeWitt, T.J. (2005): Body shape, burst speed and escape behavior of larval anurans. *Oikos*, 111: 582-591.
- Dey, M., Gupita, A. (2002): A note on morphometry of tadpole and adult of *Microhyla ornata* (Dumeril & Bibron) (Anura: Microhylidae). *Zoos' Print Journal*, 17: 951-953.
- Di Cerbo, A.R., Biancardi, C.M. (2010): Morphometric study on tadpoles of *Bombina variegata* (Linnaeus, 1758) (Anura; Bombinatoridae). *Acta Herpetologica* 5: 223-231.
- Dijk, B., Laurila, A., Orizaola, G., Johansson, F. (2016): Is one defence enough? Disentangling the relative importance of morphological and behavioural predator-induced defences. *Behavioral ecology and sociobiology*, 70: 237- 246.
- Dryden I.L., Mardia K.V. (1998): *Statistical shape analysis*. Wiley, New York, p. 376.
- Duellman, E.W., Trueb, L. (1986): *Biology of Amphibians*, New York: McGraw-Hill.
- Duellman, E.W., Trueb, L. (1994): *Biology of Amphibians*, The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, p. 670.
- Dufresnes, C., Wassef, J., Ghali, K., Brelsford, A., Stöck, M., Lymberakis, P., Crnobrnja-Isailović, J., Perrin, N. (2013): Conservation phylogeographics: does historical diversity account for regional vulnerability in European tree frogs (*Hyla arborea*)? *Molecular Ecology* 22: 5669-5684.
- Dugès, A. (1834): Recherches sur l'ostéologie et la myologie des batraciens a leurs différens ares. *Mémoires de l'Académie (royale) des sciences de l'Institut (imperial) de France, Sci. Math. Phys*, 6: 1-216.
- Džukić, G. (1968): New records of distribution and ecology *Rana graeca* Boulenger, 1891 and *Rana ridibunda* Pallas, 1771 in Yugoslavia. *Archives of Biological Sciences*, 20: 5-6.
- Eaton, B.R., Paszkowski, C.A., Kristensen, K., Hiltz, M. (2005): Life-history variation among populations of Canadian toads in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Zoology*, 83: 1421-1430.
- Edgington, E.S. (1995): *Randomization Tests*. Marcel Dekker, New York, NY.
- Escoriza, D., Ben Hassine, J. (2014): Phenotypic variability in larvae of two species of Mediterranean spadefoot toad: an approach using linear and geometric morphometrics. *African journal of herpetology*, 63: 152-165.
- Eterovick, P.C., Rievers, C.R., Kopp, K., Wachlevski, M., Franco, B.P., Dias, C.J., Barata, I.M., Ferreira, A.D., Afonso, L.G. (2010): Lack of phylogenetic signal in the variation in anuran microhabitat use in southeastern Brazil. *Evolutionary Ecology*, 24: 1-24.
- Etkin, W.E. (1932): Growth and resorption phenomena in anuran metamorphosis, *Physiological Zoology*, 5: 275-300.
- Feliciello, I., Picariello, O., Chinali, G. (2006): Intra-specific variability and unusual organization of the repetitive units in a satellite DNA from *Rana dalmatina*: molecular evidence of a new mechanism of DNA repair acting on satellite DNA. *Gene*, 383: 81-92.
- Ferland-Raymond, B., Murray, D.L. (2008): Predator diet and prey adaptive responses: Can tadpoles distinguish between predators feeding on congeneric vs. conspecific prey? *Canadian Journal of Zoology*, 86: 1329-1336.



- Floyd, R., Eyuaalem, A., Papert, A., Blaxter, M.L. (2002): Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular ecology*, 11: 839-850.
- Garriga, N., Llorente, G.A. (2012): Chondrocranial ontogeny of *Pelodytes punctatus* (Anura: Pelodytidae). Response to competition: geometric morphometric and allometric change analysis. *Acta Zoologica*, 93: 453-464.
- Gasc, J.P., Cabela, A., Crnobrnja-Isailovic, J., Dolmen, D., Grossenbacher, K., Haffner, P., Lescure, J., Martens, H., Martínez Rica, J.P., Maurin, H., Oliveira, M.E., Sofianidou, T.S., Veith, M., Zuiderwijk, A. (eds) (1997): Atlas of amphibians and reptiles in Europe, Collection Patrimoines Naturels, Societas Europaea Herpetologica, Muséum National d'Histoire Naturelle & Service du Patrimoine Naturel, Paris, p. 496.
- Gesner, C. (1551 – 1604): *Historia Animalium*. Frankfurt: I. Wecheli.
- Ghalambor, C.K., Hoke, K.L., Ruell, E.W., Fischer, E.K., Reznick, D.N., Hughes, K.A. (2015): Non-adaptive plasticity potentiates rapid adaptive evolution of gene expression in nature. *Nature*, 525: 372-375.
- Goldstein, P.Z., DeSalle, R. (2011): Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description. *BioEssays* 33: 135-147.
- Good, P. (1994): *Permutation Test: A Practical Guide to Resampling Methods for Testing Hypotheses*. Springer-Verlag, New York, p. 228.
- Gosner, K.L. (1959): Systematic variations in tadpole teeth with notes on food. *Herpetologica*, 15: 203-210.
- Gosner, K.L. (1960): A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16: 183-190.
- Gosner, K.L., Black, I.H. (1954): Larval development in *Bufo woodhousei fowleri* and *Scaphiopus holbrooki holbrooki*. *Copeia*, 1954: 251-255.
- Gosner, K.L., Black, I.H. (1957): Larval development in New Jersey Hylidae. *Copeia*, 1957: 31-36.
- Griffen, B.D., Mosblack, H. (2011): Predicting diet and consumption rate differences between and within species using gut ecomorphology. *Journal of Animal Ecology*, 80: 854-863.
- Grosjean, S. (2005): The choice of external morphological characters and developmental stages for tadpole-based anuran taxonomy: a case study in *Rana (Sylvirana) nigrovittata* (Blyth, 1855) (Amphibia, Anura, Ranidae). *Contributions to Zoology*, 74: 61-76.
- Grossenbacher, B. (1997a): *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840. – In: Gasc J.P., Cabela A., Crnobrnja-Isailovic J., Dolmen D., Grossenbacher K., Haffner P., Lescure J., Martens H., Martínez Rica J.P., Maurin H., Oliveira M.E., Sofianidou T.S., Veith M., Zuiderwijk A. (eds): Atlas of amphibians and reptiles in Europe, Collection Patrimoines Naturels, Societas Europaea Herpetologica, Muséum National d'Histoire Naturelle & Service du Patrimoine Naturel, Paris, p. 496.
- Grossenbacher, B. (1997b): *Rana temporaria* Linnaeus, 1758. – In: Gasc J.P., Cabela A., Crnobrnja-Isailovic J., Dolmen D., Grossenbacher K., Haffner P., Lescure J., Martens H., Martínez Rica J.P., Maurin H., Oliveira M.E., Sofianidou T.S., Veith M., Zuiderwijk A. (eds): Atlas of amphibians and reptiles in Europe, Collection Patrimoines Naturels, Societas Europaea Herpetologica, Muséum National d'Histoire Naturelle & Service du Patrimoine Naturel, Paris, p. 496.
- Guindon S., Gascuel O. (2003): A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704.

- Gutzeit, E. (1889): Die Hornzähne der Batrachier larven. Diss. Inaug. Zool. Univ. Albertina, Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Haad, B., Vera Candioti, M.F., Baldo, D. (2011): Shape variation in lentic and lotic tadpoles of *Melanophryniscus* (Anura: Bufonidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 46: 91-99.
- Haas, A. (2003): Phylogeny of frogs as inferred from primarily larval characters (Amphibia: Anura). *Cladistics*, 19: 23-89.
- Hair, J.F., Black, W.C., Babin, B.J., Anderson, R.E. (2010): *Multivariate data analysis*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, p.816.
- Hall, J.A., Larsen, Jr. J.H., Fitzner, R.E. (2002): Morphology of the prometamorphic larva of the Spadefoot toad, *Scaphiopus intermontanus* (Anura: Pelobatidae), with an emphasis on the lateral line system and mouthparts. *Journal of Morphology*, 252: 114-130.
- Hall, T.A. (1999): BioEdit - A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hampton, S.H., Volpe, E.P. (1963): Development and interpopulation variability of the mouthparts of *Scaphiopus holbrooki*. *American Midland Naturalist*, 70: 319-328.
- Handrigan, R.G., Wassersug, J.R. (2007): The anuran Bauplan: a review of the adaptive, developmental, and genetic underpinnings of frog and tadpole morphology, *Biological Reviews*, 82: 1-25.
- Hartel (2005): Aspects of breeding activity of *Rana dalmatina* and *Rana temporaria* reproducing in a seminatural pond. *North-Western Journal of Zoology*, 1: 5-13.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270: 313-321.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W. (2004a): Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 14812-14817.
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S., Francis, C.M. (2004b): Identification of birds through COI DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2: 1-7.
- Héron-Royer, L.F., Van Bambeke, C. (1881): Sur les caractères fournis par la bouche des tetrads des batraciens anoures d'Europe. *Bulletin de la Société zoologique de France*, 6: 75-81.
- Héron-Royer, L.F., Van Bambeke, C. (1889): Le vestibule de la bouche chez les tetrads des batraciens anoures d'Europe. *Archives de biologie*, 9: 185-309, plates 12-24.
- Hewitt, J. (1927): Further description of Reptiles and Batrachians from South Africa. *Records of the Albany Museum*, 3: 404-407.
- Hillis, D.M., Wilcox, T.P. (2005): Phylogeny of the New World true frogs (*Rana*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34: 299-314.
- Hinckley, M.H. (1881): On some differences in the mouth structure of the amouros batrachians found in Milton, Mass. *Proceedings of the Boston Society of Natural History*, 21: 307-315, plate 5.
- Hsu, F.H., Lin, R.S., Wu, S.H., Tsai, C.F. (2011): Taxonomic status of the *Rana sauteri* complex: discordance between genetic and morphological traits. *Herpetological Journal*, 21: 169-179.
- Hutchinson, T. (1796): *The natural history of the frog fish of Surinam*. p. 8, 4 plates. York: G. Peacock.
- IBM Corp. (2013): *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0*. Armonk, NY: IBM Corp.
- Ilić, M., Stamenković, G., Nikolić, Marković V., Marinković N., Paunović M., Crnobrnja-Isailović J. (2016): Identification of syntopic anuran species in early tadpole stages: Correspondence

- between morphometric and genetic data. *Applied Ecology and Environmental Research*, 14: 381-397.
- Ilić, M., Jojić, V., Stamenković, G., Marković, V., Simić, V., Paunović, M., Crnobrnja-Isailović, J. (2019): Geometric vs. traditional morphometric methods for exploring morphological variation of tadpoles at early developmental stages. *Amphibia-Reptilia*, 40: 499-509.
- Inger, R.F. (1956): Some amphibians from the lowlands of North Borneo. *Fieldiana Zoology*, 34: 389-424.
- Iosob G.A., Prisecaru M. (2014): Observations on the life cycle and reproductive behavior in *Rana dalmatina* F. *Biologie*, 23: 50-59.
- Irschick, D.J., Losos, J.B. (1999): Do lizards avoid habitats in which performance is submaximal? The relationship between sprinting capabilities and structural habitat use in Caribbean anoles. *American Naturalist*, 154: 293-305.
- IUCN (2001). IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK. <https://portals.iucn.org/library/efiles/documents/RL-2001-00102nd.pdf>.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature), Conservation International & NatureServe. 2009a. *Rana dalmatina*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-3. <http://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 10 December 2019.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature), Conservation International & NatureServe. 2009b. *Rana graeca*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-3. <http://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 10 December 2019.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature), Conservation International & NatureServe. 2009c. *Rana temporaria*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-3. <http://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 10 December 2019.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature), Conservation International & NatureServe. 2009d. *Bufo bufo*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-3. <http://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 10 December 2019.
- Ivanović, A., Kalezić, M. (2013): Evolucionarna morfologija. Teorijske postavke i geometrijska morfometrija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Ivanović, A., Sotiropoulos, K., Džukić, G., Kalezić, M.L. (2009): Skull size and shape variation versus molecular phylogeny: a case study of alpine newts (*Mesotriton alpestris*, Salamandridae) from the Balkan Peninsula. *Zoomorphology*, 128: 157-167.
- Ivanović, A., Cvijanović, M., Kalezić, M.L. (2011): Ontogeny of body form and metamorphosis: insights from the crested newts. *Journal of Zoology*, 283: 153-161.
- Jablonski, D. (2017): Approaches to macroevolution: 1. General concepts and origin of variation. *Evolutionary biology*, 44: 427-450.
- Johansson, F., Richter-Boix, A. (2013): Within-population developmental and morphological plasticity is mirrored in between-population differences: linking plasticity and diversity. *Evolutionary biology* 40: 494-503.
- Johansson, F., Lederer, B., Lind, M.I. (2010): Trait performance correlations across life stages under environmental stress conditions in the common frog, *Rana temporaria*. *PLoS One* 5: e11680.
- Johnson, J.B., Burt, D.B., DeWitt, T.J. (2008): Form, function, and fitness: Pathways to survival. *Evolution*, 62: 1243-1251.

- Johnson, J.B., Saenz, D., Adams, C.K., Hibbitts, T.J. (2015): Naturally occurring variation in tadpole morphology and performance linked to predator regime. *Ecology and Evolution*, 5: 2991-3002.
- Jojić, V. (2010): Održavanje B hromozoma u populacijama žutogrlog miša *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia): Geometrijsko-morfometrijska analiza komponenti morfološke varijabilnosti. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Jojić, V., Bugarski-Stanojević, V., Blagojević, J., Vujošević, M. (2014): Discrimination of the sibling species *Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus* (Rodentia, Muridae). *Zoologischer Anzeiger*, 253: 261-269.
- Kalezić, M., Tomović Lj., Džukić, G. (2015): Crvena knjiga faune Srbije I - Vodozemci Srbije, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu i Zavod za zaštitu prirode Srbije, p. 207.
- Kaliontzopoulou, A. (2011): Geometric morphometrics in herpetology: modern tools for enhancing the study of morphological variation in amphibians and reptiles. *Basic and Applied Herpetology*. 25: 5-32.
- Kaliontzopoulou, A., Carretero, M.A., Llorente, G.A. (2008) Head shape allometry and proximate causes of head sexual dimorphism in *Podarcis lizards*: joining linear and geometric morphometrics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93: 111-124.
- Karanović, T., Đurakić, M., Eberhard, S.M. (2016): Cryptic species or inadequate taxonomy? Implementation of 2D geometric morphometrics based on integumental organs as landmarks for delimitation and description of copepod taxa. *Systematic Biology*, 65: 304-327.
- Katzenberger, M., Hammond, J., Duarte, H., Tejedo, M., Calabuig, C., Relyea, R.A. (2014): Swimming with predators and pesticides: how environmental stressors affect the thermal physiology of tadpoles. *PLoS One* 9, e98265.
- Keiffer, H. (1888): Recherches sur la structure et le développement des dents et du bec cornés chez *Alytes obstetricans*. *Archives de biologie*, 9: 55-81.
- Kendall D.G. (1977): The diffusion of shape. *Advances in Applied Probability*, 9: 428-430.
- Klingenberg C.P. (2002): Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene*, 287: 3-10.
- Klingenberg, C.P. (2011): MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11: 353-357.
- Klingenberg, C.P. (2013): Visualizations in geometric morphometrics: how to read and how to make graphs showing shape changes. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24: 15-24.
- Klingenberg, C.P. (2016): Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Development genes and evolution*, 226: 113-137.
- Klingenberg C.P., Monteiro, L.R. (2005): Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. *Systematic Biology*, 54: 678-688.
- Kruger, D.J., Weldon, C., Du Preez, L.H. (2011): Resolving the confusion: *Amietia vertebralis* and *A. umbraculata* tadpole morphology. *African Zoology*, 46: 309-319.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.
- Kuzmin, S., Papenfuss, T., Sparreboom, M., Ugurtas, I., Tarkhishvili, D., Anderson, S., Andreone, F., Corti, C., Nyström, P., Schmidt, B., Anthony, B., Ogrodowczyk, A., Ogielska, M., Bosch, J., Tejed, M. (2004): *Rana dalmatina*. In: IUCN Red List of Threatened Species, www.iucnredlist.org.

- Kuzmin, S., Ishchenko, V., Tuniyev, B., Beebee, T., Andreone, F., Nyström, P., Anthony, B.P., Schmidt, B., Ogrodowczyk, A., Ogielska, M., Bosch, J., Miaud, C., Loman, J., Cogalniceanu, D., Kovács, T., Kiss, I. (2009): *Rana temporaria*. In: IUCN Red List of Threatened Species, www.iucnredlist.org.
- Lachenbruch, P.A. (1967): An almost unbiased method of obtaining confidence intervals for the probability of misclassification in discriminant analysis. *Biometrics*, 23: 639-645.
- Laland, K.N., Uller, T., Feldman, M.W., Sterelny, K., Müller, G.B., Moczek, A.P., Jablonka, E., Odling-Smee, F.J. (2015): The extended evolutionary synthesis: its structure, assumptions and predictions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282: 20151019.
- Lambiris, A.J.L. (1987): Description of the tadpole of *Strongylopus hymenopus* (Boulenger, 1920) (Amphibia: Anura: Ranidae) and a key to described southern African tadpoles of the genus. *Annals of the Natal Museum*, 28: 455-462.
- Lambiris, A.J.L. (1988): *Frogs and Toads of the Natal Drakensberg*. University of Natal Press, Pietermaritzburg.
- Lambiris, A.J.L. (1989): A review of the amphibians of Natal. *The Lammergeyer*, 39: 1-210.
- Lande, R. (2009): Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. *Journal of Evolutionary Biology*, 22:1435-1446.
- Lannoo, M.J., Townsend, D.S., Wassersug, R.J. (1987): Larval life in the leaves: Arboreal tadpole types, with special attention to the morphology, ecology, and behavior of the oophagous *Osteopilus brunneus* (Hylidae) larva. *Fieldiana Zoology*, 38:1-31.
- Larson, A., Chippindale, P. T. (1993): Molecular approaches to the evolutionary biology of plethodontid salamanders. *Herpetologica*, 49: 204-215.
- Larson, P.M. (2002): Chondrocranial development in larval *Rana sylvatica* (Anura: Ranidae): morphometric analysis of cranial allometry and ontogenetic shape change. *Journal of Morphology*, 252: 131-144.
- Larson, P.M. (2004): Chondrocranial morphology and ontogenetic allometry in larval *Bufo americanus* (Anura, Bufonidae). *Zoomorphology*. 123: 95-106.
- Larson, P.M. (2005): Ontogeny, phylogeny, and morphology in anuran larvae: morphometric analysis of cranial development and evolution in *Rana* tadpoles (Anura: Ranidae). *Journal of Morphology*, 264: 34-52.
- Larson, P.M., de Sá, R.O. (1998): Chondrocranial morphology of *Leptodactylus* larvae (Leptodactylidae: Leptodactylinae): its utility in phylogenetic reconstruction. *Journal of Morphology*, 238: 287-305.
- Lataste, F. (1879): Étude sur le Discoglosse. *Actes de la Société linnéenne de Bordeaux*, 33:275-341, plates 3-5.
- Lawing, A.M., Polly, P.D. (2010): Geometric morphometrics: recent applications to the study of evolution and development. *Journal of Zoology*, 280: 1-7.
- Lazarević, M., Milovanović, D., Simonović, P., Simić, V., Simić, S., Cakić, P., Paunović, M. (2011): Chapter 1, Introduction. In: *The Danube in Serbia – the results of national program of the Second Joint Danube Survey*, ed. P. Simonović, V. Simić, S. Simić, M. Paunović. Republic of Serbia, Ministry of Agriculture, Forestry and Water management – Directorate for Water; Uni. of Belgrade, Institute of for biological research “Siniša Stanković”; Uni. Kragujevac, Faculty of Science, 1/1-/20.
- Lescure, J. (1968): Le comportement social des batraciens. *Revue du Comportement Animal*, 2: 1-33.

- Levene, H. (1960): Robust tests for equality of variances 1. Contributions to probability and statistics: Essays in honor of Harold Hotelling, 2: 278-292.
- Levis, N.A., Pfennig, D.W. (2016): Evaluating 'plasticity-first' evolution in nature: key criteria and empirical approaches. Trends in Ecology & Evolution, 31: 563-574.
- Levis, N.A., Pfennig, D.W. (2018): Phenotypic plasticity, canalization, and the origins of novelty: evidence and mechanisms from amphibians. In: Seminars in cell & developmental biology, Academic Press.
- Levis, N.A., Isdaner, A.J., Pfennig, D.W. (2018): Morphological novelty emerges from pre-existing phenotypic plasticity. Nature ecology & evolution, 2: 1289-1297.
- Leydig, F. (1876): Über die Allgemeinen Bedeckungen der Amphibien. Archiv für mikroskopische Anatomie, 12: 119-242.
- Liem, K.F., Kaufman, L.S. (1984): Intraspecific macroevolution: functional biology of the polymorphic cichlid species *Cichlasoma minckleyi*, in: Echelle, A.A., Kornfield, I. (eds.), Evolution of Fish Species Flocks. University of Maine Press, Orono, ME, 203-215.
- Lima, M.S.C.S., Pederassi, J. (2012): Morphometrics and ratio of body proportionality of tadpoles of *Rhinella icterica* (Anura, Bufonidae) at different development stages. Brazilian Journal of Biology, 72: 623-629.
- Lymberakis, P., Crnobrnja-Isailović, J., Ajtić, R., Vogrin, M., Haxhiu, I. (2009): *Rana graeca*. In: IUCN Red List of threatened species, www.iucnredlist.org.
- Mace, G.M. (2004): The role of taxonomy in species conservation. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 359: 711-719.
- Maglia, A.M., Pugener, L.A., Trueb, L. (2001): Comparative development of anurans: Using phylogeny to understand ontogeny. American Zoologist: 41: 538-551.
- Malkmus, R., Kosuch, J. (2000): Description of a new *Ansonia* larva (*Ansonia guibei*) from Borneo. Salamandra, 36: 121-124.
- Mallo, D., Posada, D. (2016): Multilocus inference of species trees and DNA barcoding. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 371: 20150335.
- Marques, N.S., Nomura, F. (2015): Where to live? How morphology and evolutionary history predict microhabitat choice by tropical tadpoles. Biotropica, 47: 227-235.
- Masel, J., King, O.D., Maughan, H. (2007): The loss of adaptive plasticity during long periods of environmental stasis. American Naturalist, 169: 38-46.
- Mayr, E. (1959): The emergence of evolutionary novelties, in The Evolution of Life: Evolution after Darwin, (ed) Tax, S. University Chicago Press, Chicago, 1: 349-380.
- McDiarmid, R.W., Altig, R. (1999): Tadpoles: the biology of anuran larvae. The University of Chicago Press, Chicago.
- Merilä, J., Laurila, A., Laugen, A.T., Räsänen, K., Pakkala, M. (2000): Plasticity in age and size at metamorphosis in *Rana temporaria* comparison of high and low latitude populations. Ecography, 23: 457-465.
- Merilä, J., Laurila, A., Laugen, A.T., Räsänen, K. (2004): Heads or tails? Variation in tadpole body proportions in response to temperature and food stress. Evolutionary Ecology Research, 6: 727-738.
- Meyers, L.A., Bull, J.J. (2002): Fighting change with change: adaptative variation in an uncertain world. Trends in Ecology & Evolution, 17: 551-557.

- Miaud, C., Guyétant, R., Faber, H. (1999): Age, size and growth of the alpine newt *Triturus alpestris* (Urodela: Salamandridae) at high altitudes and a review of life history trait variation throughout its range. *Herpetologica*, 56: 135-144.
- Miner, B.G., Sultan, S.E., Morgan, S.G., Padilla, D.K., Relyea, R.A. (2005): Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in ecology & evolution*, 20: 685-692.
- Moczek, A.P. (2008): On the origins of novelty in development and evolution. *Bioessays*, 30: 432-447.
- Moczek, A.P., Sultan, S., Foster, S., Ledón-Rettig, C., Dworkin, I., Nijhout, H.F., Abouheif, E., Pfennig, D.W. (2011): The role of developmental plasticity in evolutionary innovation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278: 2705-2713.
- Monteiro, L.R. (1999): Multivariate regression models and geometric morphometrics: the search for causal factors in the analysis of shape. *Systematic Biology*, 48: 192-199.
- Monteiro, L.R., Bordin, B., dos Reis, S.F. (2000): Shape distance, shape spaces and the comparison of morphometric methods. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 217-220.
- Morrison, C., Hero, J.M. (2003): Geographic variation in life-history characteristics of amphibians: a review. *Journal of Animal Ecology*, 72: 270-279.
- Mosimann, J.E. (1970): Size allometry: size and shape variables with characterizations of the lognormal and generalized gamma distributions. *Journal of the American Statistical Association*, 65: 930-945.
- Mosimann, J.E., James, F.C. (1979): New statistical methods for allometry with application to Florida red-winged blackbirds. *Evolution* 33: 444-459.
- Murren, C.J., Auld, J.R., Callahan, H., Ghalambor, C.K., Handelsman, C.A., Heskell, M.A., Kingsolver, J.G., Maclean, H.J., Masel, J., Maughan, H., Pfennig, D.W., Relyea, R.A., Seiter, S., Snell-Rood, E., Steiner, U.K., Schlichting, C.D. (2015): Constraints on the evolution of phenotypic plasticity: limits and costs of phenotype and plasticity. *Heredity*, 115: 293-301.
- Nichols, R.J. (1937): Taxonomic studies on the mouth parts of larval Anura. *Illinois biological monographs*, 15: 1-73.
- Orton, G.L. (1946): Larval development of the eastern narrow mouthed frog, *Microhyla carolinensis* (Holbrook), in Louisiana. *Annals of the Carnegie Museum*, 30: 241-247.
- Orton, G.L. (1947): Notes on some hylid tadpoles in Louisiana. *Annals of the Carnegie Museum*, 30: 363-379.
- Orton, G.L. (1952): Key to genera of tadpoles in the United States and Canada. *The American Midland Naturalist*, 47: 382-395.
- Orton, G.L. (1953): The systematic of vertebrate larvae. *Systematic Zoology*, 2: 63-75.
- Orton, G.L. (1957): The bearing of larval evolution on some problems in frog classification. *Systematic Zoology*, 6: 79-86.
- Oxnard C.E. (1978): On biologist's view of morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 9: 219-241.
- Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I., Vences, M. (2010): The integrative future of taxonomy. *Frontiers in zoology*, 7: 16.
- Panov, V.E., Alexandrov, B.G., Arbaciuskas, K., Binimelis, R., Copp, G.H., Grabowski, M., Lucy, F., Leuven, R.S.E.W., Nehring, S., Paunović, M., Semenchenko, V., Son, M.O. (2009): Assessing the risks of aquatic species invasions via European inland waterways: from concepts to environmental indicators. *Integrated environmental assessment & Management*, 5: 100-126.

- Pante, E., Schoelinck, C., Puillandre, N. (2015): From integrative taxonomy to species description: One step beyond. *Systematic Biology*, 64: 152-160.
- Paunović, M., Cakić, P., Hegediš, A., Kolarević, J., Lenhardt, M. (2004): A report of *Eriocheir sinensis* (H. Milne Edwards, 1854) (Crustacea: Brachyura: Gradsida) from Serbian part of the Danube River. *Hydrobiologia*, 529: 275-277.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Teglia, C.M., Martinuzzi, C., Goicoechea, H.C. (2017): Ecotoxicity of veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae. *Environmental toxicology and pharmacology*, 51: 114-123.
- Peres-Neto, A.P.R., Legendre, P., Dray, S., Borcard, D. (2006): Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology*, 87: 2614-2625.
- Pezzuti, T.L., Fernandes, I.R., Leite, F.S.F., De Sousa, C.E., Garcia, P.C.A., Rossa-Feres, D. (2016): The tadpoles of the neotropical *Scinax catharinae* group (Anura, Hylidae): Ecomorphology and descriptions of two new forms. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 261: 22-32.
- Pfennig, D.W., Murphy, P.J. (2000): Character displacement in polyphenic tadpoles. *Evolution*, 54: 1738-1749.
- Pfennig, D.W., McGee, M. (2010): Resource polyphenism increases species richness: a test of the hypothesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365: 577-591.
- Pfennig, D.W., Pfennig, K.S. (2012): *Evolution's Wedge: Competition and the Origins of Diversity*, University of California Press, Berkeley, CA.
- Pfennig, D.W., Wund, M.A., Snell-Rood, E.C., Cruickshank, T., Schlichting, C.D., Moczek, A.P. (2010): Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 25: 459-467.
- Picariello, O., Feliciello, I., Bellinello, R., Chinali, G. (2002): S1 satellite DNA as a taxonomic marker in brown frogs: molecular evidence that *Rana graeca graeca* and *Rana graeca italica* are different species. *Genome*, 45: 63-70.
- Pigliucci, M. (2001): *Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Pigliucci, M., Murren, C.J. (2003): Genetic assimilation and a possible evolutionary paradox: can macroevolution sometimes be so fast as to pass us by? *Evolution*, 57: 1455-1464.
- Pigliucci, M., Murren, C.J., Schlichting, C.D. (2006): Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *Journal of Experimental Biology*, 209: 2362-2367.
- Piqué, N., López, A., Vieites, D.R., Nieto-Román, S., Vences, M. (2000): Tadpole density, microhabitat use and daily activity cycles in a Pyrenean population of *Rana temporaria*. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 11: 28-31.
- Platnick, N.I. (2013): The information content of taxon names: A reply to de Queiroz and Donoghue. *Systematic biology*, 62: 175-176.
- Price, T.D., Qvarnstrom, A., Irwin, D.E. (2003): The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270: 1433-1440.
- Priestley, A.S., Gorman, T.A. Haas, C.A., (2010): Comparative morphology and identification of Florida bog frog and bronze frog tadpoles. *Florida Scientist*, 73: 20.



- Priti, H., Gururaja, K.V., Ravikanth, G. (2015): Morphology, natural history and molecular identification of tadpoles of three endemic frog species of *Nyctibatrachus* Boulenger, 1882 (Anura: Nyctibatrachidae) from central Western Ghats, India. *Journal of natural history*, 49: 2667-2681.
- Pujol-Buxó, E., San Sebastián, O., Garriga, N., Llorente, G.A. (2013): How does the invasive/native nature of species influence tadpoles' plastic responses to predators? *Oikos*, 122: 19-29.
- Pujol-Buxó, E., Montori, A., Campeny, R. and Llorente, G. (2017): Observations on the intraspecific variation in tadpole morphology in natural ponds. *Acta Herpetologica*, 12: 193-197.
- Quinn, G.P., Keough, M.J. (2002): *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press, p. 558.
- Radovanović, M. (1951): *Vodozemci i gmizavci naše zemlje*, Štamparsko preduzeće Budućnost, Novi Sad, p. 250.
- Recuero, E., Canestrelli, D., Voros, J., Szabo, K., Poyarkov, N.A., Arntzen, J.W., Crnobrnja-Isailović, J., Kidov, A.A., Cogalniceanu, D., Caputo, F.P., Nascetti, G., Martinez-Solano, I. (2012): Multilocus species tree analyses resolve the radiation of the widespread *Bufo bufo* species group (Anura, Bufonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62: 71-86.
- Reh, W, Seitz, A. (1990): The influence of land use on the genetic structure of populations of the common frog *Rana temporaria*. *Biological Conservation*, 54: 239-250.
- Relyea, R.A. (2000): Trait-mediated indirect effects in larval anurans: reversing competition with the threat of predation. *Ecology*, 81: 2278-2289.
- Relyea, R.A. (2001): Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators. *Ecology*, 82: 523-540.
- Relyea, R.A. (2002): Competitor-induced plasticity in tadpoles: consequences, cues, and connections to predator-induced plasticity. *Ecological Monographs*, 72: 523-540.
- Relyea, R.A. (2004): Fine-tuned phenotypes: tadpole plasticity under 16 combinations of predators and competitors. *Ecology*, 85: 172-179.
- Relyea, R.A. (2005): The heritability of inducible defenses in tadpoles. *Journal of Evolutionary Biology*, 18: 856-866.
- Relyea, R.A., Werner, E.E. (2000): Morphological plasticity in four larval anurans distributed along an environmental gradient. *Copeia*, 2000: 178-190.
- Relyea, R.A., Hoverman, J.T. (2003): The impact of larval predators and competitors on the morphology and fitness of juvenile treefrogs. *Oecologia*, 134: 596-604.
- Richardson, J.M.L. (2001): The relative roles of adaptation and phylogeny in determination of larval traits in diversifying anuran lineages. *The American Naturalist*, 157: 282-299.
- Richardson, J.M.L. (2002): Burst swim speed in tadpoles inhabiting ponds with different top predators. *Evolutionary ecology research*, 4: 627-642.
- Richter-Boix, A., Llorente, G.A., Montori, A. (2006a): Effects of phenotypic plasticity on post-metamorphic traits during pre-metamorphic stages in the anuran *Pelodytes punctatus*. *Evolutionary Ecology Research*, 8: 309-320.
- Richter-Boix, A., Llorente, G.A., Montori, A. (2006b): A comparative analysis of the adaptive developmental plasticity hypothesis in six Mediterranean anuran species along a pond permanency gradient. *Evolutionary Ecology Research*, 8: 1139-1154.
- Richter-Boix, A., Llorente, G.A., Montori, A. (2007): A comparative study of predator-induced phenotype in tadpoles across a pond permanency gradient. *Hydrobiologia*, 583: 43-56.

- Robinson, J., Griffiths, R., Jeffries, P. (2003): Susceptibility of frog (*Rana temporaria*) and toad (*Bufo bufo*) eggs to invasion by *Saprolegnia*. *Amphibia-Reptilia*, 24: 261-268.
- Roelants K, Haas A, Bossuyt F. (2011): Anuran radiations and evolution of tadpole morphospace. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 8731-8736.
- Rohlf, F.J. (1990): Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21: 299-316.
- Rohlf, F.J. (1999): Shape statistics: procrustes superimpositions and tangent spaces. *Journal of Classification*, 16: 197-223.
- Rohlf, F.J. (2000): On the use of shape space to compare morphometric methods. *Hystrix, Italian Journal of Mammalogy*, 11: 9-25.
- Rohlf, F.J. (2015a): TpsDig. Version 2.18. Department of Ecology and Evolution. State University of New York, Stony Brook, NY (Available at <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>).
- Rohlf, F.J. (2015b): The tps series of software. *Hystrix, Italian Journal of Mammalogy*, 26: 9-12.
- Rohlf, F.J. (2017a): TpsUtil. Version 1.74. Department of Ecology and Evolution. State University of New York, Stony Brook, NY (Available at <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>).
- Rohlf, F.J. (2017b): TpsRelw. Version 1.67. Department of Ecology and Evolution. State University of New York, Stony Brook, NY (Available at <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>).
- Rohlf, F.J., Slice, D. (1990): Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology*, 39: 40-59.
- Romansic, J.M., Diez, K.A., Higashi, E.M., Johnson, J.E., Blaustein, A.R. (2009): Effects of the pathogenic water mold *Saprolegnia ferax* on survival of amphibian larvae. *Diseases of aquatic organisms*, 83: 187-193.
- Rösel von Rosenhof, A.J. (1753 – 1758): *Historia naturalis Ranarum nostratium*. Nürnberg.
- Saha, B.K., Gupta, B.B.P. (2011): The development and metamorphosis of an endangered frog, *Rana leptoglossa* (Cope, 1868). *International Journal of Advanced Biological Research*, 1: 67-76.
- Saint-Ange, M. (1831): Recherches anatomiques et physiologiques sur les organes transitoires et la métamorphose des batraciens. *Annales des sciences naturelles, Zoologie*, p. 34.
- Sarasola-Puente, V., Gosá, A., Oromí, N., Madeira, M.J., Lizana, M. (2011): Growth, size and age at maturity of the agile frog (*Rana dalmatina*) in an Iberian Peninsula population. *Zoology*, 114: 150-154.
- Satel, S., Wassersug, R.J. (1981): On the relative sizes of buccal floor depressor and elevator musculature in tadpoles. *Copeia*, 1981: 129-137.
- Sayed, A.E.D.H., Wassif, E.T., Elballouz, A.I. (2016): Morphological and morphometric study on the early developmental stages of the Egyptian toad *Bufo regularies* Reuss. *Edorium Journal of Anatomy and Embryology*, 3: 1-14.
- Schlichting, C.D., Wund, M.A. (2014): Phenotypic plasticity and epigenetic marking: an assessment of evidence for genetic accommodation. *Evolution*, 68: 656-672.
- Schmalhausen, I.I. (1949): *Factors of Evolution: The Theory of Stabilizing Selection*. University of Chicago Press, Chicago.
- Schneider, R.F., Meyer, A. (2017): How plasticity, genetic assimilation and cryptic genetic variation may contribute to adaptive radiations. *Molecular Ecology*, 26: 330-350.
- Schulze, A., Jansen, M., Köhler, G. (2015): Tadpole diversity of Bolivia's lowland anuran communities: molecular identification, morphological characterisation, and ecological assignment. *Zootaxa*, 4016:1-111.

- Schulze, F.E. (1888): Über die inneren Kiemen der Batrachierlarven. I. Mittheilung. Über das Epithel der Lippen, der Mund-, Rachen- und Kiemenhöhle erwachsener Larven von *Pelobates fuscus*. Abhandlungen der Preussischen Akademie der Wissenschaften, Preussische Akademie der Wissenschaften zu Berlin, 1888: 1-59, 4 plates.
- Schwander, T., Leimar, O. (2011): Genes as leaders and followers in evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 26: 143-151.
- Seppä, P., Laurila, A. (1999): Genetic structure of island populations of the anurans *Rana temporaria* and *Bufo bufo*. *Heredity*, 82: 309-317.
- Severtsova, E.A., Gutiérrez D.R.A., Severtsov, A.S. (2012): Morphometry as a Method of Studying Adaptive Regulation of Embryogenesis in Polluted Environments. – In: Ken-Ichi Sato (ed.) *Embryogenesis*, chapter: 23, InTech.
- Shapiro S.S., Wilk M.B. (1965): An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52: 591-611.
- Sheets, H.D. (2000): TMorphGen6. Department of Physics, Canisius College, Buffalo, NY, Available at <http://www3.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>.
- Sherratt, E., Vidal-García, M., Anstis, M., Keogh, J.S. (2017): Adult frogs and tadpoles have different macroevolutionary patterns across the Australian continent. *Nature ecology & evolution*, 1: 1385.
- Sherratt, E., Anstis, M., Keogh, J.S. (2018): Ecomorphological diversity of Australian tadpoles. *Ecology and evolution*, 8: 12929-12939.
- Sidorovska, V., Ljubisavljevic, K., Džukić, G., Kalezić, M.L. (2002): Tadpole morphology of two spadefoot toads (*Pelobates fuscus* and *P. syriacus*) (Amphibia, Anura, Pelobatidae). *Spixiana*, 25: 183-191.
- Sillero, N., Campos, J., Bonardi, A., Corti, C., Creemers, R., Crochet, P.-A., Crnobrnja Isailovic, J., Denoël, M., Ficetola, G. F., Gonçalves, J., Kuzmin, S., Lymberakis, P., de Pous, P., Rodríguez, A., Sindaco, R., Speybroeck, J., Toxopeus, B., Vieites, D.R., Vences, M. (2014): Updated distribution and biogeography of amphibians and reptiles of Europe. *Amphibia-Reptilia*, 35: 1-31.
- Simonović, P.D. (2004): Principi zoološke sistematike. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
- Simonović, P., Paunović, M., Atanacković, A., Vasiljević, B., Simić, S., Petrović, A., Simić, V. (2011): Water quality and assessment of chemical and ecological status of Danube River and its tributaries after record from the JDS2 Survey. In: *The Danube in Serbia – the results of national program of the Second Joint Danube Survey*, ed. P. Simonović, V. Simić, S. Simić, M. Paunović. Republic of Serbia, Ministry of Agriculture, Forestry and Water management – Directorate for Water; Uni. of Belgrade, Institute for biological research “Siniša Stanković”; Uni. Kragujevac, Faculty of Science, 303-320.
- Snell-Rood, E.C., Van Dyken, J.D., Cruickshank, T., Wade, M.J., Moczek, A.P. (2010): Toward a population genetic framework of developmental evolution: the costs, limits, and consequences of phenotypic plasticity. *Bioessays*, 32: 71-81.
- Sousa, V.T., Nomura, F., Venesky, M.D., Rossa-Feres, D.D.C., Pezzuti, T.L., Andrade, G.V., Wassersug, R.J. (2014): Flexible feeding kinematics of a tropical carnivorous anuran tadpole. *Journal of Zoology*, 293: 204-210.
- Starrett, P.H. (1973): Evolutionary patterns in larval morphology. In *Evolutionary biology of the anurans. Contemporary research on major problems*, edited by J.L. Vial. Columbia: University of Missouri Press, p. 215-271.

- StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com.
- Stefani, F., Gentili, A., Sacchi, R., Razzetti, E., Pellitteri-Rosa, D., Pupin, F., Galli, P. (2012): Refugia within refugia as a key to disentangle the genetic pattern of a highly variable species: the case of *Rana temporaria* Linnaeus, 1758 (Anura, Ranidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 65: 718-726.
- Strauss, R.E., Altig, R. (1992): Ontogenetic body form changes in three ecological morphotypes of anuran tadpoles. *Growth, Development & Aging*, 56: 3-16.
- Sumida, M., Ueda, H., Nishioka, M. (2003): Reproductive isolating mechanisms and molecular phylogenetic relationships among Palearctic and Oriental brown frogs. *Zoological science*, 20: 567-580.
- Susoy, V., Ragsdale, E.J., Kanzaki, N., Sommer, R.J. (2015): Rapid diversification associated with a macroevolutionary pulse of developmental plasticity. *ELife*, 4: e05463.
- Swammerdam, J. (1737 – 1738): *Biblia Natuare*. Vol. II. Leydan: I. Severinus.
- Swofford, D.L. (2003): PAUP\* Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A-G., Cosson, J-F. (1998): Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular ecology*, 7: 453-464.
- Tamura, K., Nei, M. (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512-526.
- Tarrant, J., Cunningham, M.J., Du Preez, L.H. (2008): Maluti mystery: a systematic review of *Amietia vertebralis* (Hewitt, 1927) and *Strongylopus hymenopus* (Boulenger, 1920) (Anura: Pyxicephalidae). *Zootaxa*, 1962: 33-48.
- Teacher, A.G.F., Garner, T.W.J., Nichols, R.A. (2009): European phylogeography of the common frog (*Rana temporaria*): routes of postglacial colonization into the British Isles, and evidence for an Irish glacial refugium. *Heredity*, 102: 490-496.
- Tejedo, M., Marangoni, F., Pertoldi, C., Richter-Boix, A., Laurila, A., Orizaola, G., Nicieza, A.G., Álvarez, D., Gomez-Mestre, I. (2010): Contrasting effects of environmental factors during larval stage on morphological plasticity in post-metamorphic frogs. *Climate research*, 43: 31-39.
- Teplitsky, C., Piha, H., Laurila, A., Merilä, J. (2005): Common pesticide increases costs of antipredator defenses in *Rana temporaria* tadpoles. *Environmental science & technology*, 39: 6079-6085.
- Thomas, M., Raharivololoniaina, L., Glaw, F., Vences, M., Vieites, D.R. (2005): Montane tadpoles in Madagascar: molecular identification and description of the larval stages of *Mantidactylus elegans*, *Mantidactylus madecassus*, and *Boophis laurenti* from the Andringitra Massif. *Copeia*, 2005: 174-183.
- Thompson, J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Tomašević, N., Cvetković, D., Aleksić, I., Miaud, C., Crnobrnja-Isailović, J. (2008): Interannual variation in life history traits between neighbouring populations of the widespread amphibian *Bufo bufo*. *Revue d'écologie*, 63: 73-83.
- Touchon, J.C., Warkentin, K.M. (2008): Fish and dragonfly nymph predators induce opposite shifts in color and morphology of tadpoles. *Oikos*, 117: 634-640.

- Tripković, D., Ignjatović, J., Cvijan, M., Nadeždić, M., Maljević, E., Paunović, M. (2003): Strategija monitoringa kvaliteta površinskih voda. Regionalni centar za životnu sredinu za Centralnu i Istočnu Evropu, Kancelarija u Srbiji i Crnoj Gori (National Water Monitoring Strategy).
- Tripković, D., Ignjatović, J., Cvijan, M., Nadeždić, M., Maljević, E., Paunović, M. (2004): Water monitoring in Serbia – a need for system reconstruction. *International association for Danube Research*, 35: 159-166.
- Valenzuela, N., Adams, D.C., Bowden, R.M., Gauger, A.C. (2004): Geometric morphometric sex estimation for hatchling turtles: a powerful alternative for detecting subtle sexual shape dimorphism. *Copeia*, 2004: 735-742.
- Van Bambeke, C. (1863): Recherches sur la structure de la bouche chez les tetards des batraciens anoures. *Bulletins de l'Academie Royale des Sciences, des Lettres et des Beaux Arts de Belgique*, 216: 339-354.
- Van Buskirk, J. (2000): The costs of an inducible defense in anuran larvae. *Ecology*, 81: 2813-2821.
- Van Buskirk, J. (2002): A comparative test of the adaptive plasticity hypothesis: relationships between habitat and phenotype in anuran larvae. *American Naturalist*, 160: 87-102.
- Van Buskirk, J. (2009): Getting in shape: adaptation and phylogenetic inertia in morphology of Australian anuran larvae. *Journal of evolutionary biology*, 22: 1326-1337.
- Van Buskirk, J. (2017): Spatially heterogeneous selection in nature favors phenotypic plasticity in anuran larvae. *Evolution*, 71: 1670-1685.
- Van Buskirk, J., Relyea, R.A. (1998): Selection for phenotypic plasticity in *Rana sylvatica* tadpoles. *Biological Journal of the Linnean Society*, 65: 301-328.
- Van Buskirk, J., McCollum, S.A. (1999): Plasticity and selection explain variation in tadpole phenotype between ponds with different predator composition. *Oikos*, 85: 31-39.
- Van Buskirk, J., Anderwald, P., Lüpold, S., Reinhardt, L., Schuler, H. (2003): The lure effect, tadpole tail shape, and the target of dragonfly strikes. *Journal of Herpetology*, 37: 420-424.
- Van Dijk, D.E. (1966): Systematic and field keys to the families, genera and described species of southern African anuran tadpoles. *Annals of the Natal Museum*, 18: 231-286.
- Veith, M., Vences, M., Vieites, D.R., Nieto-Roman, S., Palanca, A. (2002): Genetic differentiation and population structure within Spanish common frogs (*Rana temporaria* complex; Ranidae, Amphibia). *Folia Zoologica-Praha*, 51: 307-318.
- Veith, M., Kosuch, J., Vences, M. (2003): Climatic oscillations triggered post-Messinian speciation of Western Palearctic brown frogs (Amphibia, Ranidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 26: 310-327.
- Vejarano, S., Thomas, M., Vences, M. (2006): Comparative tadpole morphology in three species of frogs of the genus *Spinomantis* (Amphibia: Mantellidae). *Contributions to Zoology*, 75: 99-108.
- Vences, M., Nieto, M.P.S., Vieites D.R. (2002): Phenotypic plasticity of anuran larvae: environmental variables influence of body shape and oral morphology in *Rana temporaria* tadpoles. *Journal of Zoology*, 257: 155-162.
- Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y., Vieites, D.R. (2005a): Comparative performance of the *16S rRNA* gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2: 5.
- Vences, M., Thomas, M., Bonett, R.M., Vieites, D.R. (2005b): Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360: 1859-1868.

- Vences, M., Hauswaldt, J.S., Steinfartz, S., Rupp, O., Goesmann, A., Künzel, S., Orozco Wengel, P., Vieites, D.R., Nieto-Roman, S., Haas, S., Laugsch, C., Gehara, M., Bruchmann, S., Pabijan, M., Ludewig, A.-K., Rudert, D., Angelini, C., Borkin, L.J. Crochet, P.-A., Crottini, A., Dubois, A., Ficetola, G.F., Galán, P., Geniez, P., Hachtel, M., Jovanovic, O., Litvinchuk, S.N., Lymberakis, P., Ohler, A., Smirnov, N.A. (2013): Radically different phylogeographies and patterns of genetic variation in two European brown frogs, genus *Rana*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68: 657-670.
- Vences, M., Sarasola-Puente, V., Sanchez, E., Amat, F., Hauswaldt, J.S. (2017): Diversity and distribution of deep mitochondrial lineages of the common frog, *Rana temporaria*, in northern Spain. *Salamandra*, 53: 25-33.
- Vera Candiotti, M.F. (2005): Morphology and feeding in tadpoles of *Ceratophrys cranwelli* (Anura: Leptodactylidae). *Acta Zoologica*, 86: 1-11.
- Vera Candiotti, M.F. (2006): Ecomorphological guilds in anuran larvae: an application of geometric morphometric methods. *Herpetological Journal*, 16:149-162.
- Vera Candiotti, M.F., Haas, A. (2004): Three dimensional reconstruction of the hyobranchial apparatus of *Hyla nana* tadpoles (Anura: Hylidae). *Cuadernos de Herpetología*, 18: 3-15.
- Vera Candiotti, M.F., Lavilla, E.O., Echeverría, D.D. (2004): Feeding mechanisms in two treefrogs, *Hyla nana* and *Scinax nasicus* (Anura: Hylidae). *Journal of Morphology*, 261: 206-224.
- Via, S., Gomulkiewicz, R., De Jong, G., Scheiner, S.M., Schlichting, C.D., Van Tienderen, P.H. (1995): Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends in Ecology & Evolution*, 10: 212-217.
- Viscosi, V., Cardini, A. (2011): Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners. *PLoS One* 6: e25630.
- Vogt, C.C. (1842): Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte. Solothurn: Jent & Gassmann.
- Vukov, T., Kalezić, L.M., Tomović, Lj., Krizmanić, I., Jović, D., Labus, N., Džukić, G. (2013): Amphibians in Serbia Distribution and Diversity Patterns. *Bulletin of the Natural History Museum*, 6: 90-112.
- Vukov, T., Tomović, Lj., Krizmanić, I., Labus, N., Jović, D., Džukić, G., Kalezić, L.M. (2015): Conservation Issues of Serbian Amphibians Identified from Distributional, Life History and Ecological Data. *Acta Zoologica Bulgarica*, 67: 105-116.
- Vukov, T., Kuručki, M., Anđelković, M., Kolarov, N.T. (2018): Post-metamorphic ontogenetic changes in head size and shape of the pool frog (*Pelophylax lessonae*, Ranidae). *Archives of Biological Sciences*, 70: 307-312.
- Waddington, C.H. (1953): Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution*, 7: 118-126.
- Wager, V.A. (1965): *The Frogs of Southern Africa*. Punnell & Sons, Johannesburg.
- Wager, V.A. (1986): *The Frogs of Southern Africa*. Delta Books, Johannesburg.
- Wagner, G.P., Lynch, V.J. (2010): Evolutionary novelties. *Current Biology*, 20: R48-R52.
- Wassersug, R.J. (1973): Aspects of social behavior in anuran larvae, in: J.L. Vial (ed) – *Evolutionary Biology of the Anurans: Contemporary research on major problems*. Columbia: The University of Missouri Press, 273-297.
- Wassersug, R. (1976): Oral morphology of anuran larvae: Terminology and general description. *Occasional papers of the Museum of Natural History, the University of Kansas*, 49: 1-23.

- Wassersug, R. (1980): Internal oral features of larvae from eight anuran families: Functional, systematic, evolutionary, and ecological considerations. Miscellaneous publication, University of Kansas. Museum of Natural History, 68: 1-146.
- Wassersug, R.J. (1989): Locomotion in amphibian larvae (or “why aren’t tadpoles built like fishes?”). *American Zoologist*, 29: 65-84.
- Wassersug, R.J., Duellman, W.E. (1984): Oral structures and their development in egg-brooding hylid frog embryos and larvae: Evolutionary and ecological implications. *Journal of Morphology*, 182: 1-37.
- Wassersug, R.J., Hoff, K. (1985): The kinematics of swimming in anuran larvae. *Journal of Experimental Biology*, 119: 1-30.
- West-Eberhard, M.J. (2003): Developmental plasticity and evolution. New York, NY: Oxford University Press, p. 816.
- Wilbur, H.M. (1972): Competition, predation, and the structure of the *Ambystoma-Rana sylvatica* community. *Ecology*, 53: 3-21.
- Wilbur, H.M., Collins, J.P. (1973): Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science*, 182: 1305-1314.
- Will, K.W., Mishler, B.D., Wheeler, Q.D. (2005): The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54: 844-851.
- Wright A.H. (1914): North American Anura – life-histories of the Anura of Ithaca, New York. Washington, D.C., Carnegie institution of Washington, 197: 1-98.
- Wright, A.H. (1924): A new bullfrog (*Rana heckscheri*) from Georgia and Florida. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 37: 141-152.
- Wright A.H. (1932): Life-histories of the frogs of Okefinokee Swamp, Georgia. North American Salientia (Anura) no. 2. New York: Macmillan Publ.
- Wund, M.A. (2012): Assessing the impacts of phenotypic plasticity on evolution. *Integrative and Comparative Biology*, 52: 5-15.
- Young, L.J., Young, J. (1998): Statistical ecology. Springer Science & Business Media, New York.
- Yuan, Z.Y., Zhou, W.W., Chen, X., Poyarkov Jr, N.A., Chen, H.M., Jang-Liaw, N.H., Kuzmin, S.L. (2016): Spatiotemporal diversification of the true frogs (genus *Rana*): a historical framework for a widely studied group of model organisms. *Systematic Biology*, 65: 824-842.
- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D. (2012): Geometric Morphometrics for biologists: a primer. Academic Press, p. 488.
- Ziegler, T., Vences, M. (2002): The tadpole of *Rhacophorus verrucosus* Boulenger, 1893 from Vietnam (Amphibia: Anura: Rhacophoridae). *Faunistische Abhandlungen Staatliches Museum für Naturkunde Dresden*, 22: 319-327.
- Zorić, K., Vranković, J., Cakić, P., Tomović, J., Vasiljević, B., Simić, V., Paunović, M. (2011): Introduced species of aquatic macroinvertebrates. In: The Danube in Serbia – the results of national program of the Second Joint Danube Survey, (eds) P. Simonović, V. Simić, S. Simić, M. Paunović. Republic of Serbia, Ministry of Agriculture, Forestry and Water management – Directorate for water; Uni. of Belgrade, Institute of for biological research “Siniša Stanković”; Uni. Kragujevac, Faculty of Science, 267-280.

## **8. PRILOZI**



Prilog Tabela 1. Fizičko-hemijski parametri mereni na mestima uzorkovanja uspešno odgajenih punoglavaca.

	datum	T (°C)	pH	konduktivitet ( $\mu\text{S}/\text{cm}^3$ )	NaCl (ppm)	KCl (ppm)	NO <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub>	PO <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub>
Avala, jezero Zuce	11.3.2015.	9,5	8,5	476	334	331	0,02	0,14	1	0,6
Grza, ribnjaci	15.3.2015.	12,8	8,2	315	152	115	0,03	0,02	3,5	0,6
Lučani, Gorobilje	15.3.2015.	12,3	8,4	400	110	205	0,1	0,19	1,1	2
Požega, Moravica	15.3.2015.	11	8	405	115	220	0,06	0,38	1,9	0,6
Kragujevac, Petrovačka reka	14.3.2015.	10	8,1	380	216	254	0,05	0,2	2,1	0,9

Prilog Tabela 2. Fizičko-hemijski parametri mereni u akvarijumima.

	T (°C)	pH	konduktivitet ( $\mu\text{S}/\text{cm}^3$ )	NaCl (ppm)	KCl (ppm)	NO <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub>	PO <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub>
<i>R. dalmatina</i>	17 - 23	8	180 - 480	195 - 202	200 - 208	0,02 - 0,04	0,165	0,35 - 1	0,8 - 4
<i>R. temporaria</i>	17 - 23	8	148 - 527	157 - 258	170 - 264	0,04 - 0,1	0,97	0,75 - 1,1	0,6 - 1,55
<i>B. bufo</i>	17 - 23	8	185 - 453	163 - 220	168 - 226	0,03 - 0,05	0,03	0,5 - 1,01	0,5 - 0,7

Prilog Tabela 3. Lista analiziranih uzoraka sekvenci *16S rRNA* gena i lokaliteta sa geografskim koordinatama u Srbiji. Identifikacioni brojevi sekvenci (engl. *Accession/ID numbers*) iz *GenBank* baze podataka; radni nazivi izolata su dati u zagradama; boldovane sekvence odgovaraju uzorcima koji su uključeni u morfometrijske analize, a dvoslovne skraćenice označavaju zemlje porekla uzoraka; *R. greca* uzorci RG\_M77 i RG\_M84 su dobijeni analizom uzoraka iz Batrahološke zbirke Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, Srbija. Sekvence prijavnih brojeva KR136355 - KR136364 publikovane su u Ilić i sar. (2016), a MH791097 - MH791150 u Ilić i sar. (2019).

Vrsta	ID sekvence	Zemlja porekla (lokalitet u Srbiji)	Koordinate lokaliteta u Srbiji
<i>Rana dalmatina</i>	AY147941_DE	Nemačka	
	Y11976_FR	Francuska	
	AY014381_ES	Španija	
	GQ259206_MD	Moldavija	
	GQ259205_MD	Moldavija	
	KY762043_ES	Španija	
	KR136355_RS (M1_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	KR136356_RS (M2_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	KR136357_RS (M5_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	MH791090 (RD_M12_RS)	Srbija (Divčibare)	44.1069, 20.0055
	MH791091 (RD_M13_RS)	Srbija (Đerdap)	44.6311, 22.5372
	MH791092 (RD_M15_RS)	Srbija (Divčibare)	44.1078, 20.0103
	MH791093 (RD_M16_RS)	Srbija (Divčibare)	44.1078, 20.0103
	MH791094 (RD_M17_RS)	Srbija (Divčibare)	44.1078, 20.0103
	MH791095 (RD_M18_RS)	Srbija (Divčibare)	44.1078, 20.0103
	MH791096 (RD_M19_RS)	Srbija (Divčibare)	44.1078, 20.0103
	MH791097 (RD_M20_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	MH791098 (RD_M21_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	MH791099 (RD_M22_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	MH791100 (RD_M23_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	MH791101 (RD_M24_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	MH791102 (RD_M25_RS)	Srbija (Požega)	43.8498, 20.0797
	MH791103 (RD_M26_RS)	Srbija (Požega)	43.8498, 20.0797
	MH791104 (RD_M27_RS)	Srbija (Požega)	43.8498, 20.0797
	MH791105 (RD_M40_RS)	Srbija (Kragujevac)	44.0521, 20.8806
	MH791106 (RD_M41_RS)	Srbija (Kragujevac)	44.0521, 20.8806
	MH791107 (RD_M42_RS)	Srbija (Kragujevac)	44.0521, 20.8806
	MH791108 (RD_M55_RS)	Srbija (Divčibare)	44.1078, 20.0103
	MH791109 (RD_M56_RS)	Srbija (Divčibare)	44.1078, 20.0103
	MH791110 (RD_M57_RS)	Srbija (Divčibare)	44.1078, 20.0103
	MH791111 (RD_M58_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	MH791112 (RD_M59_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	MH791113 (RD_M60_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	MH791114 (RD_M63_RS)	Srbija (Premeća)	43.7696, 20.4295
MH791115 (RD_M70_RS)	Srbija (Divčibare)	44.1078, 20.0103	
MH791116 (RD_M71_RS)	Srbija (Divčibare)	44.1078, 20.0103	
MH791117 (RD_M79_RS)	Srbija (Premeća)	43.7696, 20.4295	
MH791118 (RD_M83_RS)	Srbija (Sjenica)	43.2541, 19.9847	

Vrsta	ID sekvence	Zemlja porekla (lokalitet u Srbiji)	Koordinate lokaliteta u Srbiji
<i>Rana graeca</i>	AY147942_GR	Grčka	
	KX269199_ME	Crna Gora	
	KR136364 (11M_RS)	Srbija (Brvenica)	43.3498, 20.5895
	MH791119 (RG_M65_RS)	Srbija (Gradac)	44.2373, 19.8807
	MH791120 (RG_M68_RS)	Srbija (Korenita)	44.5100, 19.3712
	MH791121 (RG_M72_RS)	Srbija (Divčibare)	44.1069, 20.0055
	MH791122 (RG_M77_RS)	Srbija (Kraljevo)	43.7515, 20.7475
	MH791123 (RG_M84_RS)	Srbija (Zvonce)	42.9356, 22.5818
<i>Rana temporaria</i>	JF299206_ES	Španija	
	DQ283129_DE	Nemačka	
	KC977170_FR	Francuska	
	AB058882_RU	Rusija	
	KC977157_RU	Rusija	
	KJ128957_SE	Švedska	
	KC977158_UA	Ukrajina	
	AB685766_CZ	Češka	
	KC977178_IT	Italija	
	KC977177_HR	Hrvatska	
	KT074475_ES	Španija	
	KY762044_ES	Španija	
	KX269196_UA	Ukrajina	
	AY147956_DE	Nemačka	
	KR136358_RS (3M_RS)	Srbija (Bigar)	44.2238, 21.8722
	KR136359_RS (6M_RS)	Srbija (Bigar)	44.2238, 21.8722
	KR136360_RS (7M_RS)	Srbija (Bigar)	44.2238, 21.8722
	MH791124 (RT_1-19_RS)	Srbija (Lučani)	43.8600, 20.1689
	MH791125 (RT_1-20_RS)	Srbija (Lučani)	43.8600, 20.1689
	MH791126 (RT_M14_RS)	Srbija (Đerdap)	44.3935, 22.1743
	MH791127 (RT_M28_RS)	Srbija (Lučani)	43.8600, 20.1689
	MH791128 (RT_M29_RS)	Srbija (Lučani)	43.8600, 20.1689
	MH791129 (RT_M30_RS)	Srbija (Lučani)	43.8600, 20.1689
	MH791130 (RT_M31_RS)	Srbija (Grza)	44.8964, 21.6459
	MH791131 (RT_M32_RS)	Srbija (Grza)	44.8964, 21.6459
	MH791132 (RT_M33_RS)	Srbija (Grza)	44.8964, 21.6459
	MH791133 (RT_M43_RS)	Srbija (Grza)	44.8964, 21.6459
	MH791134 (RT_M44_RS)	Srbija (Grza)	44.8964, 21.6459
	MH791135 (RT_M45_RS)	Srbija (Grza)	44.8964, 21.6459
	MH791136 (RT_M46_RS)	Srbija (Lučani)	43.8600, 20.1689
MH791137 (RT_M47_RS)	Srbija (Lučani)	43.8600, 20.1689	
MH791138 (RT_M48_RS)	Srbija (Lučani)	43.8600, 20.1689	
MH791139 (RT_M74_RS)	Srbija (Vlasina)	42.7526, 22.3263	

Vrsta	ID sekvence	Zemlja porekla (lokalitet u Srbiji)	Koordinate lokaliteta u Srbiji
<i>Bufo bufo</i>	AY555021_IT	Italija	
	AY555020_IT	Italija	
	AY840247_TR	Turska	
	AY555025_TR	Turska	
	AY555022_GR	Grčka	
	AY840230_GR	Grčka	
	JX218105_HR	Hrvatska	
	JX218100_UA	Ukrajina	
	JQ348765_AU	Austrija	
	KF665394_CZ	Češka	
	KT239421_SE	Švedska	
	KT239398_SE	Švedska	
	KR136361_RS (4M_RS)	Srbija (Trešnjica)	44.1217, 19.4992
	KR136362_RS (8M_RS)	Srbija (Trešnjica)	44.1217, 19.4992
	KR136363_RS (9M_RS)	Srbija (Trešnjica)	44.1217, 19.4992
	MH791140 (BB_M34_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	MH791141 (BB_M35_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	MH791142 (BB_M36_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	MH791143 (BB_M37_RS)	Srbija (Grza)	44.8964, 21.6459
	MH791144 (BB_M39_RS)	Srbija (Grza)	44.8964, 21.6459
	MH791145 (BB_M49_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	MH791146 (BB_M50_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	MH791147 (BB_M51_RS)	Srbija (Avala)	44.6822, 20.5521
	MH791148 (BB_M52_RS)	Srbija (Grza)	44.8964, 21.6459
	MH791149 (BB_M53_RS)	Srbija (Grza)	44.8964, 21.6459
	MH791150 (BB_M54_RS)	Srbija (Grza)	44.8964, 21.6459

Prilog Tabela 4. Vrednosti u milimetrima (sirove linearne mere) za varijable: HH – visina glave, HL – dužina glave, E – prečnik oka, TH – visina repa, TL – dužina repa, CC – visina mišića repa, VT – rastojanje između analnog otvora i vrha repa, DIT – rastojanje između dorzalne insercije repnog peraja i vrha repa, DIS – rastojanje između dorzalne insercije repnog peraja i vrha njuške, VS – rastojanje između analnog otvora i vrha njuške, TOTL – ukupna dužina punoglavca.

vrsta	HH	HL	E	TH	TL	CC	VT	DIT	DIS	VS	TOTL
<i>R. dalmatina</i>	4,00	6,32	0,56	4,01	10,25	1,15	9,69	12,22	4,86	7,24	16,55
<i>R. dalmatina</i>	3,74	6,41	0,55	4,02	10,22	1,18	9,82	13,01	4,11	7,11	16,59
<i>R. dalmatina</i>	3,99	6,52	0,57	4,30	11,02	1,25	10,07	14,47	3,87	7,65	17,53
<i>R. dalmatina</i>	3,82	6,02	0,49	3,84	9,08	1,04	8,64	11,74	3,89	6,81	15,07
<i>R. dalmatina</i>	3,99	6,87	0,63	4,37	11,09	1,25	10,46	14,73	3,94	7,75	17,96
<i>R. dalmatina</i>	3,78	6,53	0,51	4,09	10,19	1,12	9,62	13,60	3,66	7,38	16,68
<i>R. dalmatina</i>	3,63	6,27	0,51	3,95	10,03	1,10	9,59	13,25	3,55	7,02	16,26
<i>R. dalmatina</i>	4,05	6,43	0,56	3,93	10,46	1,15	9,69	13,88	3,72	7,45	16,88
<i>R. dalmatina</i>	3,80	6,54	0,64	4,10	10,72	1,19	10,21	13,96	3,81	7,38	17,22
<i>R. dalmatina</i>	3,15	4,94	0,44	3,27	7,54	0,88	6,82	9,89	3,00	5,93	12,46
<i>R. dalmatina</i>	3,71	7,48	0,62	4,38	11,47	1,31	10,88	14,98	4,63	8,36	18,94
<i>R. dalmatina</i>	3,23	6,37	0,53	3,63	10,19	1,25	9,74	12,65	4,56	6,96	16,55
<i>R. dalmatina</i>	3,30	6,34	0,56	3,76	9,45	1,18	8,14	12,47	4,23	7,70	15,77
<i>R. dalmatina</i>	2,41	4,85	0,43	2,73	7,79	0,95	7,45	10,38	2,89	5,26	12,64
<i>R. dalmatina</i>	3,43	5,98	0,53	3,57	9,21	1,12	8,81	12,07	4,04	6,44	15,16
<i>R. dalmatina</i>	3,70	6,95	0,57	4,24	10,91	1,34	10,42	14,27	4,26	7,76	17,86
<i>R. dalmatina</i>	3,64	7,08	0,55	4,15	11,23	1,34	10,63	14,77	4,30	7,94	18,30
<i>R. dalmatina</i>	3,90	7,67	0,66	4,28	11,36	1,39	10,77	15,29	4,77	8,32	19,01
<i>R. dalmatina</i>	4,28	7,22	0,52	4,36	11,07	1,40	10,48	13,51	5,76	7,86	18,25
<i>R. dalmatina</i>	3,83	6,95	0,58	3,86	10,87	1,22	10,27	14,05	4,58	7,73	17,82
<i>R. dalmatina</i>	2,57	4,32	0,37	2,83	7,59	0,82	7,18	9,40	2,84	4,91	11,89
<i>R. dalmatina</i>	2,50	4,37	0,36	2,83	7,97	0,84	7,54	9,85	3,01	4,97	12,34
<i>R. dalmatina</i>	2,66	4,38	0,37	2,74	7,60	0,80	7,26	9,78	2,66	4,90	11,97
<i>R. dalmatina</i>	2,39	4,36	0,37	2,83	7,97	0,86	7,51	9,89	2,66	5,08	12,27
<i>R. dalmatina</i>	2,58	4,53	0,36	2,86	7,82	0,83	7,48	9,84	2,76	5,13	12,29
<i>R. dalmatina</i>	2,69	4,50	0,36	3,00	7,86	0,76	7,57	9,73	2,80	5,05	12,27
<i>R. dalmatina</i>	2,54	4,46	0,31	2,83	7,49	0,82	6,97	9,50	2,76	5,22	11,92
<i>R. dalmatina</i>	2,89	4,69	0,38	3,01	8,09	0,90	7,57	10,17	2,99	5,47	12,75
<i>R. dalmatina</i>	2,67	4,48	0,37	2,91	7,97	0,86	7,45	9,71	2,96	5,30	12,39
<i>R. dalmatina</i>	2,59	4,59	0,41	2,73	7,74	0,83	7,25	9,99	2,88	5,21	12,33
<i>R. dalmatina</i>	2,34	5,05	0,47	2,87	7,97	0,99	7,66	10,24	2,84	5,62	12,88
<i>R. dalmatina</i>	2,47	4,91	0,54	3,06	7,84	1,03	7,50	10,13	2,77	5,49	12,64
<i>R. dalmatina</i>	2,43	4,81	0,45	2,71	7,99	0,93	7,57	10,30	2,58	5,44	12,69
<i>R. dalmatina</i>	2,54	5,08	0,48	2,82	8,04	0,91	7,76	10,34	2,80	5,59	12,95
<i>R. dalmatina</i>	2,49	4,92	0,43	2,69	7,63	0,94	7,24	9,93	2,78	5,49	12,47
<i>R. dalmatina</i>	2,38	4,87	0,50	2,84	7,91	0,93	7,46	9,97	2,91	5,52	12,67
<i>R. dalmatina</i>	2,25	4,57	0,45	2,46	7,25	0,78	6,90	9,39	2,51	5,11	11,72
<i>R. dalmatina</i>	2,12	4,46	0,42	2,38	7,23	0,81	7,02	9,05	2,64	4,81	11,55
<i>R. dalmatina</i>	2,40	4,88	0,50	2,81	7,67	0,93	7,34	9,43	3,07	5,41	12,37
<i>R. dalmatina</i>	2,09	4,72	0,28	2,03	5,89	0,84	5,76	8,36	2,31	4,97	10,52
<i>R. temporaria</i>	2,67	5,36	0,33	3,48	9,27	1,09	8,90	10,65	4,05	6,07	14,57
<i>R. temporaria</i>	2,41	5,20	0,34	3,28	9,12	1,09	8,66	10,56	3,80	5,98	14,25
<i>R. temporaria</i>	2,38	4,94	0,34	3,16	9,18	1,07	8,75	10,40	3,76	5,73	14,06

<i>R. temporaria</i>	2,33	4,88	0,37	3,24	8,54	1,00	8,03	9,90	3,63	5,69	13,37
<i>R. temporaria</i>	2,75	5,56	0,28	3,59	9,13	1,08	8,74	10,35	4,37	6,30	14,61
<i>R. temporaria</i>	2,39	5,10	0,32	3,15	8,46	1,10	8,11	9,73	3,74	5,84	13,41
<i>R. temporaria</i>	2,48	5,10	0,32	3,26	8,84	0,99	8,47	10,39	3,61	5,79	13,87
<i>R. temporaria</i>	2,54	5,42	0,34	3,34	9,22	1,05	8,86	10,71	3,98	6,09	14,57
<i>R. temporaria</i>	2,67	5,46	0,37	3,56	9,02	1,13	8,66	10,59	3,94	6,21	14,39
<i>R. temporaria</i>	2,41	5,40	0,36	3,23	9,19	1,12	8,73	10,65	3,96	6,20	14,50
<i>R. temporaria</i>	2,48	5,66	0,40	3,35	9,77	1,22	9,37	11,10	4,29	6,45	15,30
<i>R. temporaria</i>	2,68	5,47	0,40	3,17	10,14	1,17	9,54	11,43	4,37	6,32	15,59
<i>R. temporaria</i>	2,62	6,12	0,50	3,53	9,82	1,28	9,35	11,09	4,85	6,96	15,83
<i>R. temporaria</i>	2,97	6,00	0,45	3,69	10,50	1,29	9,91	12,17	4,50	6,90	16,45
<i>R. temporaria</i>	2,50	5,71	0,38	3,15	9,81	1,11	9,34	11,22	4,50	6,41	15,50
<i>R. temporaria</i>	2,51	5,52	0,37	3,12	9,93	1,06	9,40	11,53	4,09	6,23	15,42
<i>R. temporaria</i>	2,50	6,07	0,45	3,36	10,78	1,20	10,22	12,23	4,77	6,90	16,81
<i>R. temporaria</i>	2,68	5,80	0,41	3,41	10,06	1,22	9,70	11,47	4,53	6,46	15,82
<i>R. temporaria</i>	2,54	6,10	0,49	3,48	10,22	1,26	9,73	11,81	4,82	6,78	16,31
<i>R. temporaria</i>	2,48	5,64	0,38	3,13	9,75	1,13	9,43	11,32	4,15	6,24	15,33
<i>R. temporaria</i>	2,18	5,33	0,39	3,22	8,83	1,05	8,54	10,36	3,88	5,84	14,11
<i>R. temporaria</i>	2,93	6,00	0,42	3,63	10,07	1,15	9,50	11,79	4,51	6,86	16,05
<i>R. temporaria</i>	2,10	5,26	0,40	3,07	8,78	1,04	8,44	10,18	3,95	5,80	14,00
<i>R. temporaria</i>	2,60	5,19	0,39	3,65	9,54	1,20	8,79	10,98	3,96	6,22	14,70
<i>R. temporaria</i>	2,93	5,86	0,38	3,73	10,27	1,18	9,54	12,21	4,03	6,94	16,07
<i>R. temporaria</i>	2,76	5,60	0,43	3,28	9,92	1,13	9,11	11,44	4,18	6,69	15,48
<i>R. temporaria</i>	2,77	5,57	0,44	3,28	9,36	1,15	8,62	11,04	4,08	6,58	14,90
<i>R. temporaria</i>	2,93	5,90	0,46	3,79	10,57	1,27	9,83	12,48	4,09	7,06	16,38
<i>R. temporaria</i>	2,94	5,88	0,50	3,75	10,29	1,21	9,67	11,87	4,50	6,82	16,13
<i>R. temporaria</i>	2,08	4,66	0,37	2,68	7,87	0,86	7,22	8,20	4,40	5,53	12,48
<i>R. temporaria</i>	2,71	5,67	0,37	3,72	9,66	1,20	8,92	11,58	3,91	6,76	15,26
<i>R. temporaria</i>	2,61	5,69	0,45	3,57	9,85	1,17	9,08	12,19	3,57	6,69	15,51
<i>R. temporaria</i>	2,66	5,58	0,49	3,56	9,77	1,13	8,90	11,86	3,72	6,72	15,31
<i>R. temporaria</i>	2,56	5,15	0,39	3,18	9,79	1,01	9,17	11,39	3,62	6,12	14,86
<i>R. temporaria</i>	2,66	5,75	0,47	3,81	10,56	1,22	10,02	13,09	3,41	6,65	16,27
<i>R. temporaria</i>	2,68	5,58	0,46	3,60	10,09	1,21	9,28	11,97	3,82	6,73	15,61
<i>R. temporaria</i>	2,56	5,41	0,39	3,64	9,46	1,20	8,77	11,20	3,77	6,46	14,81
<i>R. temporaria</i>	2,53	5,41	0,40	3,40	9,27	1,11	8,67	10,96	3,81	6,34	14,60
<i>R. temporaria</i>	2,51	5,69	0,39	3,42	9,97	1,08	9,45	11,92	3,83	6,51	15,59
<i>R. temporaria</i>	2,35	5,16	0,41	3,41	8,95	1,11	8,10	10,63	3,48	6,39	13,98
<i>B. bufo</i>	3,39	6,70	0,48	3,44	9,76	1,15	8,93	11,67	4,77	7,98	16,32
<i>B. bufo</i>	3,37	5,93	0,38	3,11	8,11	1,06	7,81	9,86	4,39	6,50	14,01
<i>B. bufo</i>	3,38	6,00	0,37	3,02	7,85	1,01	7,50	9,10	4,91	6,61	13,82
<i>B. bufo</i>	2,97	5,60	0,42	3,05	7,91	0,94	7,60	8,92	4,73	6,19	13,48
<i>B. bufo</i>	3,41	5,56	0,35	3,11	7,47	0,95	7,13	8,89	4,35	6,17	13,01
<i>B. bufo</i>	3,45	5,81	0,40	2,91	8,20	0,91	7,90	9,65	4,69	6,31	14,01
<i>B. bufo</i>	2,94	5,12	0,33	2,83	6,90	0,80	6,19	8,01	4,30	5,97	12,02
<i>B. bufo</i>	3,14	5,81	0,45	3,11	8,27	0,95	7,87	10,22	4,28	6,35	14,09
<i>B. bufo</i>	3,27	7,00	0,50	3,88	9,87	1,33	9,00	11,36	5,70	8,20	16,84
<i>B. bufo</i>	3,38	5,83	0,43	3,28	7,90	0,97	7,54	9,02	4,95	6,44	13,71
<i>B. bufo</i>	4,14	7,40	0,65	3,88	10,38	1,33	9,40	12,01	6,17	8,63	17,78
<i>B. bufo</i>	3,83	6,72	0,47	3,71	10,19	1,39	9,52	11,83	5,53	7,60	16,91
<i>B. bufo</i>	4,48	7,62	0,60	4,06	11,12	1,34	10,30	12,41	6,69	8,72	18,73

<i>B. bufo</i>	4,25	7,36	0,69	3,83	10,38	1,30	9,41	12,22	5,91	8,57	17,74
<i>B. bufo</i>	4,30	7,17	0,69	4,33	11,14	1,45	10,10	12,74	6,04	8,42	18,31
<i>B. bufo</i>	4,49	7,52	0,64	4,04	11,09	1,35	10,07	12,45	6,61	8,74	18,61
<i>B. bufo</i>	4,15	7,36	0,56	4,09	10,68	1,40	9,90	12,00	6,30	8,46	18,03
<i>B. bufo</i>	3,96	7,44	0,67	4,14	10,78	1,47	10,04	12,32	6,27	8,45	18,21
<i>B. bufo</i>	4,22	7,52	0,61	3,96	10,92	1,33	10,19	11,99	6,64	8,60	18,39
<i>B. bufo</i>	4,01	7,64	0,66	4,14	10,79	1,38	9,93	12,31	6,50	8,72	18,43
<i>B. bufo</i>	2,64	4,49	0,33	2,47	6,16	0,87	5,49	6,84	4,10	5,30	10,66
<i>B. bufo</i>	2,46	4,42	0,34	2,44	6,16	0,88	5,47	6,72	4,06	5,28	10,57
<i>B. bufo</i>	2,25	4,36	0,38	2,26	5,96	0,79	5,62	6,78	3,72	4,83	10,31
<i>B. bufo</i>	2,25	4,37	0,29	2,27	6,10	0,83	5,75	6,61	4,04	4,82	10,45
<i>B. bufo</i>	2,21	4,11	0,25	1,96	4,81	0,68	4,58	5,86	3,15	4,48	8,89
<i>B. bufo</i>	1,78	3,85	0,24	2,05	4,96	0,72	4,24	4,97	3,95	4,77	8,78
<i>B. bufo</i>	2,15	3,82	0,25	2,34	5,17	0,78	4,90	5,98	3,17	4,25	8,97
<i>B. bufo</i>	1,95	4,07	0,27	2,25	5,35	0,76	5,02	6,08	3,53	4,51	9,41
<i>B. bufo</i>	1,74	3,94	0,19	2,08	4,44	0,66	4,28	4,94	3,56	4,23	8,36
<i>B. bufo</i>	1,70	3,70	0,20	2,02	3,95	0,66	3,68	4,76	2,88	4,18	7,58
<i>B. bufo</i>	3,48	6,09	0,41	3,22	8,49	1,16	8,13	9,70	5,20	6,63	14,58
<i>B. bufo</i>	3,92	6,57	0,32	3,84	8,64	1,26	8,44	9,92	5,74	6,96	15,21
<i>B. bufo</i>	3,45	6,40	0,51	3,46	8,15	1,15	7,92	9,18	5,75	6,80	14,55
<i>B. bufo</i>	4,20	6,78	0,40	3,31	8,36	1,20	7,95	10,19	5,45	7,27	15,13
<i>B. bufo</i>	3,68	6,31	0,48	3,59	8,97	1,24	8,47	10,10	5,52	7,07	15,28
<i>B. bufo</i>	3,61	6,22	0,43	3,67	8,15	1,23	7,78	9,34	5,38	6,84	14,36
<i>B. bufo</i>	3,65	6,66	0,36	3,39	8,42	1,25	8,29	9,61	5,81	6,96	15,08
<i>B. bufo</i>	3,13	6,09	0,37	3,55	7,92	1,15	8,04	8,42	5,82	6,29	14,00
<i>B. bufo</i>	3,60	6,15	0,38	3,42	8,08	1,18	7,70	8,91	5,75	6,68	14,22
<i>B. bufo</i>	3,28	4,84	0,33	2,98	7,20	1,01	6,82	7,44	4,91	5,39	12,04



## BIOGRAFIJA

Marija D. Ilić je rođena 10.09.1984. godine u Beogradu. Osnovnu školu je završila u Beogradu, kao i prva tri razreda Pete beogradske gimnazije (prirodno-matematički smer), a četvrti razred gimnazije završava u Sjedinjenim Američkim Državama. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2003/2004. godine, studijska grupa Ekologija i zaštita životne sredine, a 2011. godine je odbranila diplomski rad pod nazivom „Floristički sastav algi gornjeg toka Dojkinačke reke na Staroj planini”, sa ocenom 10.

Doktorske akademske studije upisuje 2012/2013. godine na smeru Biologija, modul Morfologija, sistematika i filogenija životinja na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od 2012. godine volontira na Odeljenju za hidroekologiju i zaštitu voda, na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Od 2013. godine angažovana je kao istraživač pripravnik na projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja: TR 37009, „Merenje i modeliranje fizičkih, hemijskih, bioloških i morfodinamičkih parametara reka i vodnih akumulacija” i III 43002, „Biosensing tehnologije i globalni sistem za kontinuirana istraživanja i integrisano upravljanje ekosistema”. Godine 2015. je izabrana u zvanje istraživač saradnik. Od sticanja zvanja istraživač saradnik do danas, učestvuje u realizaciji više nacionalnih i međunarodnih projekata.

Od 2013. godine član je Srpskog biološkog društva, Evropskog herpetološkog društva (*Societas Europaea Herpetologica* – SEH) i Srpskog društva za zaštitu voda.

Tokom dosadašnjeg rada autor je i koautor na 16 međunarodnih naučnih radova kategorije M20, 8 u časopisima od domaćeg značaja i na 45 saopštenja na naučnim skupovima.